

**Universitätsklinikum Tübingen
Medizinische Klinik-
Abteilung Innere Medizin III**

**Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz**

**Der Einfluss thrombozytärer microRNAs
auf die myokardiale Inflammation und
das ventrikuläre Remodeling nach
Ischämie und Reperfusion
am Herzen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jan Philipp Schütte

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Borst
2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Nikolaou
3. Berichterstatter: Professor Dr. A. Polzin

Tag der Disputation: 14.12.2023

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der akute Myokardinfarkt: Pathogenese, Inflammation & Remodeling	2
1.1.1	Neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes	2
1.1.2	Die Phasen der myokardialen Heilung nach akutem Myokardinfarkt	4
1.2	Myokardialer Reperfusionsschaden	9
1.2.1	Einfluss der Reperfusion auf das Myokard	10
1.2.2	Einfluss der Reperfusion auf die koronare Zirkulation	12
1.3	Die Rolle von Thrombozyten in der Pathogenese der myokardialen I/R	14
1.4	MicroRNAs: Biogenese, Mechanismen und Funktion	18
1.4.1	Die Rolle von miRNAs in der Physiologie von Thrombozyten	25
1.5	Fragestellung	32
2	Material und Methoden	33
2.1	Material	33
2.1.1	Geräte	33
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	34
2.1.3	Chirurgische Instrumente	34
2.1.4	Pharmakologische Substanzen, Infusionslösungen	35
2.1.5	Lösungen, Medien, Reagenzien	35
2.1.6	Puffer, Zellmedien	36
2.1.7	Antikörper	37
2.1.8	Bioinformatik: Software	38
2.2	Methoden	38
2.2.1	Transgenes Mausmodell	38
2.2.2	Herzchirurgische Operation: Mausmodell- Myokardiale I/R	38
2.2.3	Evans Blue/ TTC Vitalfärbung	42
2.2.4	Ticagrelor Behandlung	43
2.2.5	Echokardiographische Bildgebung	43
2.2.5.1	Konventionelle murine Echokardiographie	44
2.2.5.2	Speckle-Tracking Echokardiographie: Strain-Analyse	45
2.2.6	Kardiale PET-MRT Bildgebung	46
2.2.6.1	Kardiales PET-MRT: Myokardiale Fibrose	48

2.2.6.2	Kardiales PET-MRT: Myokardiale Inflammation	48
2.2.7	Durchflusszytometrie	49
2.2.7.1	Analyse der Thrombozytenaktivierung.....	49
2.2.7.2	Analyse der Thrombozyten-Leukozyten-Koaggregate.....	50
2.2.7.3	Immunphänotypisierung myokardialer Leukozyten.....	50
2.2.8	Histologie	51
2.2.9	Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie	51
2.2.9.1	Immunfluoreszenzfärbung: Angiogenese	52
2.2.9.2	Immunfluoreszenzfärbung: Myofibroblasten	52
2.2.1	Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie (LSFM)	53
2.2.1.1	Übersicht- Technischer Versuchsaufbau	53
2.2.1.2	Probenvorbereitung- Murine Herzen.....	54
2.2.2	Next Generation Sequencing: Thrombozytäre microRNA	56
2.2.2.1	Thrombozytenisolation, Leukozytendepletion, Qualitätskontrolle	56
2.2.2.2	miRNA Sequenzierung	56
2.2.2.3	Funktionelle Prädiktionsanalyse	57
2.2.3	Flusskammer	58
2.2.4	Thrombozyten Spreading.....	58
2.2.5	Reverse Transkriptase PCR	59
2.2.6	Monozytenisolation	59
2.2.7	Boyden-Kammer Makrophagen-Migrations-Assay	60
2.2.8	Statistische Analyse.....	60
3	Ergebnisse	61
3.1	Next Generation Deep Sequencing enthüllt ein umfangreiches Repertoire an funktionellen miRNAs in murinen Thrombozyten	61
3.2	Charakterisierung der spezifischen Deletion der Ribonuklease Dicer in der Cre/loxP Maus zur Ablation der thrombozytären miRNA Biogenese	61
3.3	Megakaryozyten-/ Thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer reguliert das miRNA Repertoire in murinen Thrombozyten.....	63
3.4	Dicer-abhängig differentiell regulierte thrombozytäre miRNAs haben einen signifikanten Einfluss auf essentielle Plättchenfunktionen	64
3.5	MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer führt zu einer signifikant vergrößerten Infarktfläche und beeinträchtigten kardialen Funktion	65
3.6	Thrombozytäre Dicer-abhängige miRNAs modulieren die myokardiale Immunzell-Infiltration nach experimenteller Ischämie und Reperfusion.....	67

3.7	Thrombozytäre miRNAs regulieren die Akkumulation von Blutplättchen und proinflammatorischen Monozyten/ Makrophagen in das Myokard	69
3.8	Aufhebung der Dicer-abhängiger miRNA Prozessierung in Thrombozyten reduziert die Angiogenese und erhöht die Ausbildung von profibrotischen Myofibroblasten im Myokard nach I/R und sieben Tagen Reperfusion	72
3.9	Therapie mit dem reversiblen P2Y ₁₂ Rezeptor-Antagonisten Ticagrelor schützt vor einer vergrößerten Infarktfläche in <i>Dicer</i> ^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen	73
3.10	Aufhebung der Dicer-abhängigen miRNA Prozessierung in Plättchen führt zu einer verstärkten Narbenbildung und negativen Remodeling.....	75
3.11	Differentielle Dicer-abhängige Regulation thrombozytärer miRNAs nach myokardialer I/R	77
4	Diskussion	78
5	Zusammenfassung.....	84
6	Literaturverzeichnis	85
7	Abbildungsverzeichnis	98
8	Tabellenverzeichnis	100
9	Abkürzungsverzeichnis	100
10	Erklärung zum Eigenanteil	101
11	Danksagung	102

1 Einleitung

Die koronare Herzerkrankung (KHK) und darunter ihre schwerwiegendste Komplikation, der akute Myokardinfarkt, stellen heute die häufigste Todesursache weltweit dar [24, 25]. Insgesamt sind kardiovaskuläre Erkrankungen für etwa ein Drittel der weltweiten Todesfälle verantwortlich [26].

Im Jahr 2019 sind weltweit 8,9 Mio. Menschen an einer KHK verstorben [24]. Allein in Deutschland waren laut Angaben des Statistischen Bundesamt in diesem Jahr ca. 636.000 Einwohner aufgrund einer KHK in stationärer Behandlung, davon ca. 210.000 Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt. Das entspricht einer Hospitalisationsrate von 231 pro 100.000 Einwohner [27]. Trotz signifikanter Fortschritte in Prävention und Akutbehandlung, versterben jedes Jahr in Deutschland ca. 44.000 Menschen an einem akuten Myokardinfarkt. Kardiovaskuläre Erkrankungen verursachen mit etwa 13% (56,7 Mrd. Euro) den größten Teil der jährlichen Gesundheitskosten von 431,8 Mrd. Euro in Deutschland und haben damit eine herausragende volkswirtschaftliche Bedeutung [28].

Auch wenn in den letzten zwanzig Jahren die altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität der koronaren Herzerkrankung insbesondere in den sozioökonomisch stärkeren Ländern gesunken ist, zeichnet sich mit Blick auf das weltweite Bevölkerungswachstum und den demographischen Wandel insgesamt eine Zunahme der Menschen ab, die an einer koronaren Herzkrankheit versterben [29, 30]. Während Anfangs die KHK traditionell die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen darstellte, lässt sich inzwischen durch die gestiegene weltweite Lebenserwartung eine epidemiologische Verlagerung und Ausdehnung der Morbidität kardiovaskulärer Krankheitsbilder bis in die Entwicklungsländer beobachten mit der nunmehr höchsten Inzidenz in Nord-Afrika, dem Mittleren Osten sowie Zentral-Asien [30].

Nach einem akuten Myokardinfarkt stellt die frühe und erfolgreiche Reperfusion des Myokards die effektivste Strategie zur Reduktion der Infarktgröße und Verbesserung der klinischen Prognose dar [31, 32]. Trotz signifikanter Fortschritte in der medikamentösen und vor allem interventionellen Therapie zur Prävention und Behandlung des akuten Myokardinfarktes, entwickeln viele Patienten weiterhin trotz adäquater Akutbehandlung sekundär eine chronische Herzinsuffizienz in Folge maladaptiver myokardialer Remodelingprozesse [33, 34].

Bisher fehlen suffiziente Therapiekonzepte zur Behandlung dieser Langzeitfolgen, da die molekularen Mechanismen hinter den strukturellen Umbauprozessen im Herzen unvollständig verstanden sind. Vor dem Hintergrund der globalen Ausbreitung kardiovaskulärer Krankheitsbilder und der damit verbundenen zunehmenden Belastung für das Gesundheitssystem, ist Forschung in diesem Bereich dringend geboten.

Thrombozyten könnten dabei eine Schlüsselrolle für ein besseres Verständnis und Aufklärung dieser bisher unvollständig verstandenen Krankheitsprozesse spielen.

1.1 Der akute Myokardinfarkt: Pathogenese, Inflammation & Remodeling

Der akute Myokardinfarkt beschreibt pathophysiologisch eine Nekrose des Herzmuskels in Folge einer akuten myokardialen Ischämie und lässt sich klinisch dem Akuten Koronarsyndrom (ACS) zuordnen [12, 35]. Das Akute Koronarsyndrom stellt dabei ein Sammelbegriff für kardiale Beschwerden dar, die auf Grundlage einer Koronarinsuffizienz entstehen und ein Missverhältnis zwischen myokardialen Sauerstoffangebot und -bedarf mit daraus resultierender myokardialer Ischämie zur Folge haben. Allgemein wird beim ACS unterschieden zwischen:

1. STEMI: ST-Streckenhebungsinfarkt
2. NSTEMI: Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt
3. Instabile Angina pectoris

Nach aktuellem Verständnis lässt sich der akute Myokardinfarkt ätiologisch in fünf Subgruppen klassifizieren (Tab.: 1) [12].

Klinische Klassifikation des akuten Myokardinfarktes (AMI)	
Typ 1	Atherosklerotische Plaqueruptur/-erosion mit Koronarthrombus
Typ 2	Missverhältnis zwischen myokardialem Sauerstoffangebot und -bedarf
Typ 3	Plötzlicher Herztod in Folge eines akuten Myokardinfarktes
Typ 4	Akuter Myokardinfarkt assoziiert mit perkutaner Koronarintervention
	4a: Periinterventionell
	4b: Stent- oder Scaffold-Thrombose
	4c: Restenose
Typ 5	Akuter Myokardinfarkt assoziiert mit koronararterieller Bypasschirurgie

Tabelle 1: Klinische Klassifikation des akuten Myokardinfarktes

In einem großen Teil der Fälle entsteht der akute Myokardinfarkt auf dem Boden einer koronaren Herzerkrankung und manifestiert sich als akute thrombotische Komplikation einer atherosklerotischen Gefäßläsion an den epikardialen Koronararterien des Herzens (Typ 1).

Der langjährige häufig subklinische Verlauf der Atherosklerose als chronisch progrediente inflammatorische Erkrankung der großen Arterien steht dabei im direkten Kontrast zur häufig abrupten klinischen Präsentation des akuten Koronarsyndroms (ACS).

1.1.1 Neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes

Nach klassischem Verständnis stellt die langjährige kumulative Exposition der arteriellen Wand gegenüber LDL, einem Lipoprotein, das durch seinen Bestandteil ApoB100 definiert wird, die pathophysiologische Grundlage für die Entstehung und Progression der Atherosklerose dar [36]. LDL kann dabei in Folge einer, durch die Einwirkung von multiplen kardiovaskulären Risikofaktoren entstandenen endothelialen Dysfunktion, in der subendothelialen Intima des betroffenen Gefäßes akkumulieren, dort an Proteoglykanen gebunden Aggregate bilden und schließlich eine lokale Inflammationsreaktion auslösen, die sekundär durch Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen die transendotheliale Diapedese von inflammatorischen Zellen induziert [37]. Sowohl ausgehend von aus zirkulierenden Monozyten abgeleiteten Makrophagen als auch durch die Metaplasie von

Einleitung

glatten Muskelzellen der Media [38] entstehen über die Expression von Scavenger-Rezeptoren sog. Schaumzellen, die LDL internalisieren und so zur Lipidakkumulation und Entstehung einer atherosklerotischen Plaque führen [37]. Durch den programmierten Zelltod dieser Zellen entwickelt sich somit über die Jahre ein lipidreicher und hochthrombogener Kern, der durch eine fibröse Kappe von dem vaskulären Lumen getrennt wird [39].

Nach konventioneller Vorstellung führt die Ruptur dieser über die Zeit destabilisierten vulnerablen fibrösen Kappe zur Exposition des hochthrombogenen nekrotischen Lipidkernes der Läsionsstelle mit dem zirkulierenden Blut [40, 41]. Die dabei freigesetzten inflammatorischen Zellen und thrombogenen Faktoren führen sekundär zur Ausbildung eines okklusiven Koronarthrombus, der die Perfusion des betroffenen Koronargefäßes massiv einschränkt. Die entstandene Koronarinsuffizienz mit einer Sauerstoffminderversorgung distal der Okklusion resultiert schließlich in einem myokardialen Zelltod und nachfolgender Myokardnekrose mit ventrikulärer Dysfunktion und kardialen Arrhythmien [40].

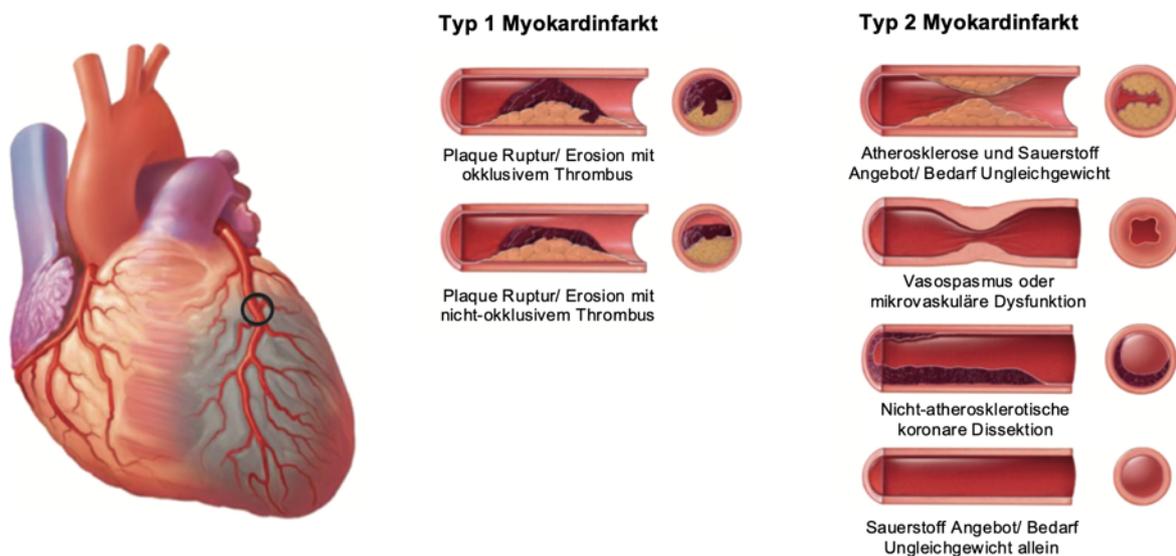


Abbildung 1: Myokardinfarkt Typen 1 und 2

Quelle: *J AM Coll Cardiol.* (2018) Thygesen et al. [12] (Modifiziert)

Das traditionelle Bild der Atherosklerose und des Myokardinfarktes hat sich dabei in den letzten Jahrzehnten grundlegend verändert [42]. Während der klassische Kandidat für einen akuten Myokardinfarkt ursprünglich weiße mittelalte männliche Patienten mit arterieller Hypertonie, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus und familiärer Prädisposition darstellten, zählen in letzter Zeit zunehmend auch Angehörige anderer ethnischer Gruppen, jüngere Frauen und ein immer älter werdendes Patientenkollektiv zu den Risikopatienten [43, 44]. Vor allem die bessere Kontrolle traditioneller kardiovaskulärer Risikofaktoren durch effektive neue medikamentöse Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der arteriellen Hypertonie und Hypercholesterinämie sowie ein verändertes Risikoverhalten dürften zu diesem Wandel beigetragen haben. Zudem nimmt nicht zuletzt auch durch die zunehmende Sensibilisierung in der klinischen Untersuchung und sensitivere diagnostische Möglichkeiten der Anteil der mit Typ 2 Myokardinfarkt diagnostizierten Patienten zu (Abb.: 1) [45]. Gleichzeitig sind mit der Ausweitung des metabolischen Syndroms, Schlaf-Apnoe-Syndrom, Mikrobiom, physische Inaktivität und Umweltverschmutzung zusätzlich neue Risikofaktoren in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses geraten [42].

Neueren klinischen Erkenntnissen zu Folge befinden sich die atherosklerotischen Plaques, die für die Entstehung eines akuten Koronarsyndromes verantwortlich sind, häufig nicht, wie lange Zeit vermutet, im Bereich hochgradiger koronararterieller Stenosen und entgehen daher der

Einleitung

konventionellen angiographischen Bildgebung sowie Therapieansätzen in Form der perkutanen Koronarintervention [46].

Stattdessen liegen die als sog. „Culprit Lesions“ bezeichneten und für die Entstehung des akuten Koronarsyndroms hauptverantwortlichen atherosklerotischen Plaques meist proximal der maximalen Koronarstenose und zeichnen sich über einen langen Zeitraum ihrer Entstehung durch ein exzentrisches, nach außen gerichtetes vaskuläres Remodeling aus, ohne maßgeblich das Lumen des betroffenen Koronargefäßes zu kompromittieren [40, 47, 48]. Die luminale Stenose dieser Läsionsorte findet hingegen erst in einer relativ späten Phase der Arterogenese statt, sobald das Plaquewachstum die kompensatorischen Fähigkeiten des Koronargefäßes zum expansivem Wachstum überschreitet [49].

Unter den Einflüssen einer effektiven Statintherapie hat sich darüber hinaus der Mechanismus des atherosklerotisch bedingten akuten Koronarsyndroms zunehmend von der traditionellen Plaqueruptur zur Plaqueerosion gewandelt [50]. Plaqueerosionen weisen einen geringeren Lipidgehalt, weniger Inflammation und eine verstärkte Fibrose auf und haben daher ein geringeres Risiko zur Ruptur, gleichzeitig spielen neu entdeckte Mechanismen wie die Freisetzung sog. neutrophiler extrazellulärer Traps (NETs) und die Thromboinflammation eine verstärkte Rolle [51].

1.1.2 Die Phasen der myokardialen Heilung nach akutem Myokardinfarkt

Der ausgeprägte Verlust von Kardiomyozyten in Folge eines akuten Myokardinfarkts überschreitet die begrenzte regenerative Kapazität des Myokards und resultiert in der kompensatorischen Formation einer aus Kollagen bestehenden Narbe [52].

Die kardialen Reparaturmechanismen nach Myokardinfarkt stellen dabei eine Abfolge von präzise aufeinander abgestimmten immunvermittelten Prozessen dar, in denen die frühe Aktivierung der Inflammation die Grundlage und zugleich notwendige Voraussetzung für die Transition in darauffolgende reparative und proliferative Umbauprozesse darstellt [19, 53].

Die kardiale Reparatur lässt sich nach aktuellem Verständnis in folgende chronologisch aufeinander abfolgende Phasen untergliedern [52]: Zunächst der **Inflammationsphase**, in der über rekrutierte Immunzellen der Abbau geschädigter Kardiomyozyten sowie extrazellulärer Matrixkomponenten erfolgt. Anschließend die **Reparations- und Proliferationsphase**, welche die Auflösung der Inflammationsphase, die Proliferation von (Myo-)Fibroblasten, Narbenformation und Neovaskularisation beinhaltet und zu guter Letzt die **Konsolidierungs- und Reifungsphase**, in der sich das Narbengewebe mit Abbau des Granulationsgewebes stabilisiert und langfristige strukturelle Umbauprozesse im Herzen im Rahmen des myokardialen Remodelings angestoßen werden (Abb.: 2).

Die Rolle der Inflammationsphase nach akutem Myokardinfarkt

In Folge einer ausreichend langen Ischämiedauer setzen Kardiomyozyten und Zellen des myokardialen Parenchyms primär im Rahmen von Nekrose und sekundär im Rahmen von Apoptose und Autophagie eine Reihe von spezifischen Mediatoren frei, den sog. DAMPs (*engl.* Danger-associated molecular patterns), welche die angeborene Immunabwehr aktivieren und eine intensive inflammatorische Antwort einleiten [52]. Zur gleichen Zeit führt die durch die Hypoxie beeinträchtigte strukturelle und funktionelle Integrität der endothelialen Grenzfläche

Einleitung

zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität und sukzessiven transendothelialen Migration von Leukozyten in das Myokard [54].

DAMPs (z.B. HMBG1, HSP, IL-1 α) binden an korrespondierenden PRRs (*engl.* Pattern-recognition receptors) (z.B. TLR/IL-1Rs, NLRs, RAGE) von infiltrierenden Leukozyten und residualen parenchymalen Zellen des Myokards, aktivieren das Komplementsystem (z.B. Komplement Faktor B) und stoßen über MAPKs/NF- κ B vermittelte Signalwege eine Kaskade von proinflammatorischen Mediatoren einschließlich Zytokinen (z.B. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18), Chemokinen (Typ CXC und CC) und unterschiedlichen Zelladhäsionsmolekülen (z.B. VCAM, ICAM, Selektine) an, welche die Rekrutierung und phänotypische Differenzierung weiterer Leukozytenpopulation steuern [55-60].

Die zentralen nukleären Effektorzellen der Inflammationsphase werden dabei von Kardiomyozyten, Endothelzellen, Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Mastzellen und Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten gebildet. Während nekrotische Kardiomyozyten den Hauptstimulus für die postischämische Inflammation darstellen, exprimieren auch residuelle vitale Kardiomyozyten aus dem Bereich der Grenzzone des Infarktbereichs ICAM-1 und synthetisieren Zytokine als auch Chemokine [61-63].

Endothelzellen stellen den häufigsten nicht-kardiomyozytären Zelltyp im Herzen dar [64]. Ihre Aktivierung im Rahmen der Hypoxie führt zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen (z.B. E-Selektin), Mobilisierung von präformierten P-Selektin/CD62P aus den Weibel-Palade-Körperchen an die Zelloberfläche und selbst zur Freisetzung eigener Zytokine und Chemokine, und ist damit die Grundlage für die adhäsive Interaktion mit aktivierten Leukozyten und deren Extravasation in das Myokard [52].

Neutrophile Granulozyten stellen nach Thrombozyten die erste Welle von Immunzellen dar, die das infarzierte Myokard infiltrieren und setzen eine Reihe von potenten proteolytischen Enzymen frei, die zur Beseitigung nekrotischer Zellen des Myokards beitragen [65]. Ihre Migration erfolgt insbesondere in Bereiche der myokardialen Grenzzone des Infarktes und wird durch die anschließende Reperfusion des Myokards verstärkt [66]. Dabei wird durch die Bindung von CXC Chemokinen an den CXCR2 Rezeptor auf der Oberfläche von Neutrophilen die konformationelle Modifikation von zelleigenen Integrinen induziert, welche die Adhäsion an die endotheliale Oberfläche sowie die anschließende Transmigration in das Myokard vermitteln [67, 68].

Anschließend erfolgt die Rekrutierung von zwei chronologisch aufeinanderfolgenden Monozytenpopulationen sowohl aus dem Knochenmark als auch der Milz [69]. In einer frühen Phase über Aktivierung der MCP-1/CCR2 Achse und Stimulierung durch IL-1 zunächst die Infiltration von proinflammatorischen Ly6C^{hi} Monozyten [70]. In einer späteren Phase schließlich die selektive Rekrutierung und Differenzierung in antiinflammatorischen Ly6C^{lo} monozytären Subpopulationen zur Auflösung des initialen proinflammatorischen Milieus. Nach Extravasation und Infiltration in das Myokard gehen aus den Monozytenpopulationen sowohl Makrophagen als auch dendritische Zellen hervor [71].

Einleitung

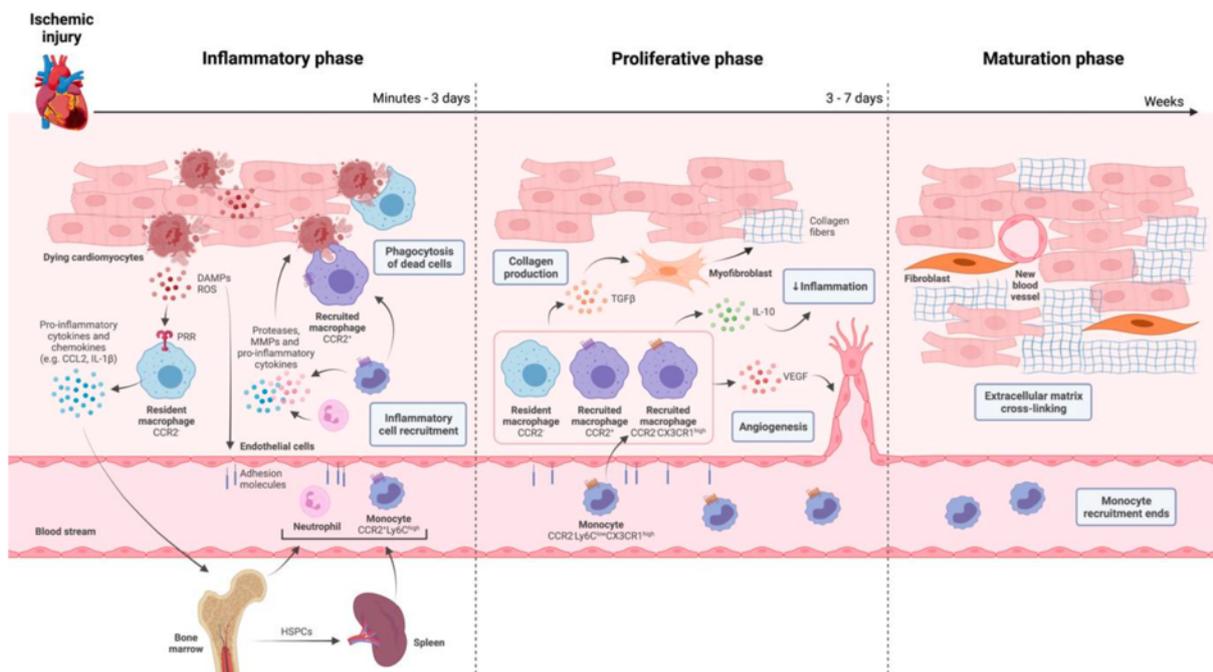


Abbildung 2: Biologische Phasen der myokardialen Heilungsprozesse nach akutem Myokardinfarkt

Quelle: *Int J Mol Sci.* (2021), Viola et al. [14]. Schematische Darstellung der chronologischen Heilungsvorgänge im Herzen nach akutem Myokardinfarkt von der Inflammationsphase, über die Proliferation- und Reparationsphase bis in die Konsolidierungs- und Reifungsphase einschließlich der zellulären Effektorzellen, deren Ursprungsort sowie relevante Mechanismen der zellulären Interaktion.

Nach heutigem Verständnis zeichnet sich die Makrohagenpopulation im murinen Herz bereits unter physiologischen Bedingungen durch eine signifikante Heterogenität und Plastizität in Bezug auf ihre Entwicklung, phänotypische Differenzierung und Funktionalität aus [71]. Nach klassischer Vorstellung können grundsätzlich zwei wesentliche Subpopulationen unterschieden werden: Eine größere CCR2^{neg} Magrophagenpopulation mit Ursprung im embryonalen Dottersack und fetalen Monozytenpopulationen, sowie eine deutlich kleinere Magrophagenpopulation, die sich in ihren Ursprung von zirkulierenden CCR2⁺ Monozyten ableitet [72]. Unter ausbleibender Reperfusion kommt es im Rahmen eines Infarktes zum vollständigen Verlust dieser residenten Makrophagenpopulation und Ersatz durch von Monozyten abgeleiteten und CCR2 exprimierenden proinflammatorischen Makrophagen, während unter rechtzeitiger Reperfusion die residente Makrophagenpopulation weitestgehend erhalten bleibt.

Das adulte Herz in Säugetieren verfügt über eine Vielzahl von kardialen Fibroblasten, deren wesentliche Aufgabe neben Modulation des inflammatorischen Milieus nach Myokardinfarkt in der Gewebekomöostase und Erhalt der extrazellulären Matrix besteht. In der frühen Phase der Inflammation nach Myokardinfarkt inhibiert die Stimulation mit IL-1 die Expression von α -SMA und damit eine vorzeitige Konversion der kardialen Fibroblasten in den synthetischen Myofibroblasten Phänotyp, um zunächst eine ungehinderte Beseitigung der Infarktfläche von geschädigten Zellen und Matrixbestandteilen zu gewährleisten [73]. Die extrazelluläre Matrix stellt dabei weit mehr als nur das strukturelle Grundgerüst des Herzens dar, sondern ist darüber hinaus aktiv in der Regulation von Inflammation und Reparatur durch die Weiterleitung molekularer Signale beteiligt [74].

Die Rolle der Reparations- und Proliferationsphase nach akutem Myokardinfarkt

Die Transition von der Inflammationsphase in die Reparations- und Proliferationsphase des Myokards wird durch präzise abgestimmte Veränderungen in der kardialen Mikroumgebung gesteuert und wesentlich durch den Zelltod kurzlebiger Neutrophilenpopulationen eingeleitet. Neutrophile Granulozyten unterstützen die Auflösung der proinflammatorischen Phase durch die Expression von zahlreichen Mediatoren (z.B. Lipiden, Annexin A1, Lactoferrin, Phosphatidylserin), welche die eigene endotheliale Transmigration herabsetzen und ihre Phagozytose durch Makrophagen einleiten sowie durch die Freisetzung von Rezeptoren, die zur Neutralisation von Chemokinen und Zytokinen führen [52].

Gleichzeitig steuern Neutrophile Granulozyten über spezifische Mediatoren ihres Sekretoms (z.B. NGAL) die Polarisation und phänotypischen Differenzierung der lokalen myokardialen Makrophagenpopulation in Richtung Subtypen mit primär reparativer Funktion [75]. Nach konventioneller Vorstellung wird dabei im inflammatorischen Kontext weiterhin zwischen den stereotypischen M1 und M2 Makrophagensubpopulationen unterschieden, auch wenn diese Nomenklatur aufgrund der Komplexität und Heterogenität der Phänotypen zunehmend verlassen wird [76].

Während in der Inflammationsphase drei bis vier Tage nach dem Infarkt ereignis die Aktivität von M1 Makrophagen ihren Höhepunkt findet und durch die Freisetzung von Zytokinen (z.B. IL-12, IL-23, IL-27, TNF- α), Chemokinen (z.B. CXCL9/10/11), Matrix-Metalloproteinasen (z.B. MMP-1/2/7/9/12) und reaktiven Sauerstoffspezies ein proinflammatorisches Milieu entsteht, kommt es nun etwa sieben Tage nach Infarkt durch die Polarisation zu M2 Makrophagen zur Entstehung eines reparativen Milieus, welches durch die Freisetzung von antiinflammatorischen, profibrotischen und angiogenen Faktoren (z.B. IL-10, TGF- β und VEGF) den strukturellen Aufbau und Umbau des geschädigten Herzens induziert [71]. Sowohl die M1 als auch M2 Makrophagensubtypen leiten sich dabei nach aktuellem Verständnis größtenteils aus den rekrutierten proinflammatorischen Ly6C^{hi} Monozyten ab, wobei es in der reparativen Phase zur phänotypischen Differenzierung von Ly6C^{hi} Monozyten zu Ly6C^{lo} Makrophagen kommt (Abb.: 3) [77].

Einleitung

Darüber hinaus erfolgt primär in der reparativen Phase die Infiltration von CD11c⁺ dendritischen Zellen in den Infarktbereich des Myokards [65]. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen eine essentielle Rolle in der adäquaten Auflösung der Inflammationsphase, Narbenformation und postischämischen Angiogenese spielen und deren Ablation in einer persistierenden Akkumulation von Ly6C^{hi} Monozyten/CD206⁻ Makrophagen, erhaltener Expression proinflammatorischer Zytokine sowie reduzierter Endothelzellproliferation und kompromittierter linksventrikulärer Funktion nach Myokardinfarkt resultierte [78].

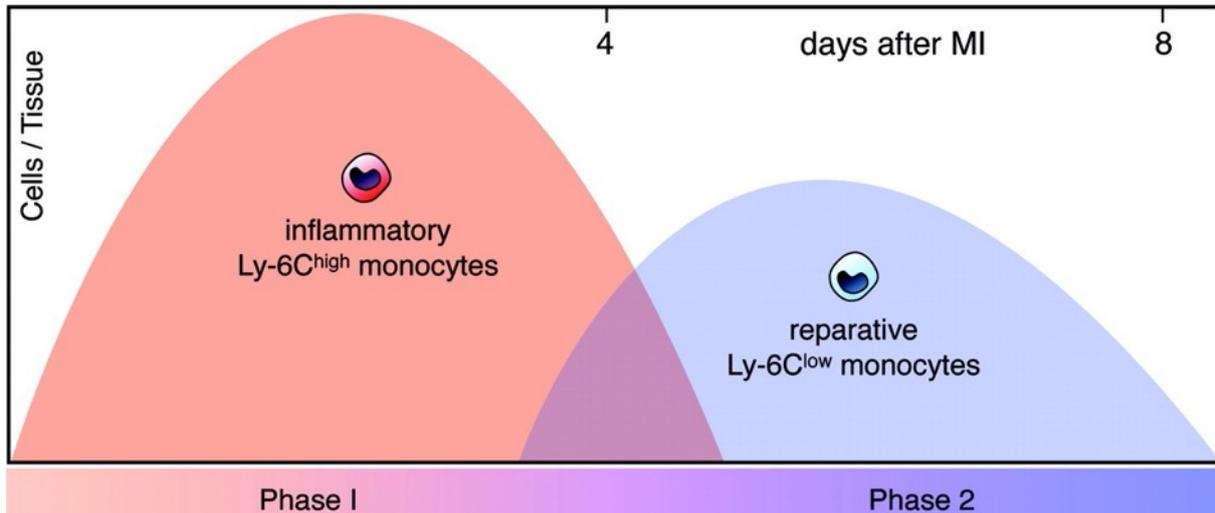


Abbildung 3: Schematische Darstellung der biphasischen monozytären Inflammation nach akutem Myokardinfarkt
Quelle: *Circulation* (2010), Nahrendorf et al. [19]

Auch T-Lymphozyten, einschließlich CD4⁺ und CD8⁺ T-Helfer-Zellen, Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen und natürliche Killerzellen, infiltrieren vor allem in der reparativen Phase das Myokard und modulieren die Immunantwort [52]. In Studien mit depletierten CD4⁺ T-Zellen und Mausmodellen mit defizienter T-Zell Antigenerkennung zeigte sich ein nachteiliges myokardiales Remodeling und dass CD4⁺ T-Zellen in Reaktion auf kardiale Autoantigene nach Myokardinfarkt aktiviert werden [79].

Angiogenese und Neovaskularisation stellen essentielle Vorgänge dar, um das geschädigte Myokard während der Reparations- und Proliferationsphase mit ausreichend Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen. Insbesondere in residuellen Kardiomyozyten der Grenzzone des Infarkts erfolgt nach Myokardinfarkt die Expression von proangiogenen Faktoren (z.B. VEGF), die sich bis in das Infarktgebiet ausbreiten [52]. Während neu gebildete Gefäße initial aufgrund der fehlenden Auskleidung mit Pericyten und perivaskulären glatten Muskelzellen eine Hyperpermeabilität mit erleichterter Immunzelldiapedese aufweisen, findet in späteren Phasen eine PDGF- β abhängige Reifung der Gefäße statt [80].

Die Expansion von kardialen Fibroblasten und Konversion in Kollagen synthetisierende Myofibroblasten durch die Expression von kontraktile Elementen (z.B. α -SMA und sMemb) nach Stimulation mit TGF- β stellen das charakteristische Kennzeichen der proliferativen Phase des myokardialen Reparaturvorganges und Narbenformation dar [52]. Der Ursprung der Myofibroblasten im Infarktgebiet ist dabei Gegenstand aktueller Forschung. Experimentellen Studien zu Folge könnten residente Tcf21 exprimierende Fibroblasten den Hauptursprung der Myofibroblasten darstellen [81]. Andere Studien zu Folge könnten auch zirkulierende Progenitorzellen aus dem Knochenmark sowie die mesenchymale Transdifferenzierung aus

Einleitung

Endothelzellen, epikardialen Epithelzellen und Pericyten zum Myofibroblastenpool beitragen [52].

Unter dem Einfluss der kardialen Myofibroblasten ist die extrazelluläre Matrix während der proliferativen Phase im heilenden Myokard stetigen dynamischen Umbauvorgängen ausgesetzt. Dabei entsteht zunächst eine provisorische und hoch plastische Matrix aus vor allem Fibrin und Fibronectin, die als Grundgerüst für migrierende als auch proliferative Zellen dient und darüber hinaus mit matrizellulären Proteinen ausgestattet ist, welche über die Modulation von Signalkaskaden die inflammatorische und reparative Antwort regulieren [82].

Die Rolle der Konsolidierungs- und Reifungsphase nach akutem Myokardinfarkt

Nach Abschluss der proliferativen Phase kommt es durch die zunehmende Vernetzung der extrazellulären Matrix und Apoptose der beteiligten reparativen Zellen zur Konsolidierung und Stabilisierung des myokardialen Narbengewebes. Der Wegfall fibrinogener Wachstumsfaktoren als auch die Freisetzung antifibrotischer Mediatoren, darunter die Bindung von IFN- γ an Protein-10/CXCL10, inhibieren die Fibroblastenmigration und führen zur räumlichen Eindämmung der myokardialen Narbe [83].

Nach Beendigung der kompensatorischen Heilungsvorgänge im Herzen kommt es bei einer Untergruppe von Patienten nach Myokardinfarkt zu einem nachteiligen myokardialen Remodeling mit progressiver ventrikulärer Dilatation und terminaler Herzinsuffizienz. Dabei handelt es sich um einen durch zahlreichende pathophysiologische Faktoren beeinflussten und in großen Teilen noch unvollständig verstandenen maladaptiven Prozess im Herzen, zu dem vor allem die initiale Infarktgröße und eine chronisch persistierende kardiale Inflammation beitragen und der mit einer signifikant reduzierten klinischen Prognose einhergeht [84].

1.2 Myokardialer Reperfusionsschaden

Nach einem akuten Myokardinfarkt stellt die frühe und erfolgreiche Reperfusion des Myokards durch primäre Thrombolyse oder perkutane Koronarintervention die effektivste Strategie zur Reduktion der Infarktgröße und Verbesserung der klinischen Prognose dar [31, 32]. Paradoxiere Weise wird dabei durch die Wiederherstellung der Koronarperfusion in dem ischämiegeschädigten Myokard selbst ein zusätzlicher Zellschaden induziert, welcher die vorteilhaften Effekte der Reperfusionstherapie kompromittiert. Dieses Phänomen wird als myokardialer Reperfusionsschaden bezeichnet [31, 85].

Schätzungen gehen davon aus, dass diese zusätzliche myokardiale Zellschädigung für bis zu 50% der finalen Infarktgröße verantwortlich sein könnte [31]. Der myokardiale Reperfusionsschaden könnte damit substantiell dazu beitragen, dass trotz optimaler primärer Reperfusionstherapie die Mortalitätsrate in Folge eines akuten Myokardinfarktes nach wie vor bei 10% liegt und die Inzidenz für ein chronisches Herzversagen fast 25% beträgt [31, 86].

Die Schädigung des Myokards während des Reperfusionsvorgangs umfasst dabei grundsätzlich vier Formen der kardialen Dysfunktion.

1. „**Myokardiales Stunning**“: Das myokardiale Stunning bezeichnet eine transiente kontraktile Dysfunktion des Herzmuskels nach Ischämie und Reperfusion trotz fehlender irreversibler Schädigung des Myokards und vollständiger Wiederherstellung der koronaren

Einleitung

Perfusionsverhältnisse [87, 88]. Die kardiale Dysfunktion ist dabei nach wenigen Tagen bis Wochen vollständig reversibel.

2. **„No-Reflow Phänomen“**: Das No-Reflow Phänomen wird auch als koronare mikrovaskuläre Dysfunktion und Obstruktion (CMVO) bezeichnet und beschreibt das Ausbleiben einer adäquaten mikrovaskulären Perfusion des ischämischen Myokards trotz Wiederherstellung der koronaren Perfusionsverhältnisse auf makrovaskulärer Ebene [89]. Die Ursachen für dieses Phänomen sind dabei multifaktoriell und am ehesten zu betrachten als Folge einer kombinierten endothelialen und myokardialen Dysfunktion im Rahmen der Ischämie, einer individuellen Prädisposition sowie im Rahmen einer distalen Embolisierung von Mikrothromben [90, 91].
3. **„Reperfusionarrhythmien“**: Dabei handelt es sich um in Folge der Reperfusion auftretende potenziell hämodynamisch relevante kardiale Arrhythmien, für die mittlerweile effektive Therapiemöglichkeiten bestehen [92].
4. **„Letaler Reperfusionsschaden“**: Ist definiert als zusätzlicher myokardialer Zellschaden, welcher durch die Wiederherstellung des koronaren Blutflusses nach einer Episode der akuten Ischämie entsteht und den zusätzlichen Zelltod vor Beginn der Reperfusion nur reversibel geschädigter Zellen induziert [93]. Die Ischämie ist somit eine notwendige Voraussetzung, aber in ihrer Auswirkung auf die Zellviabilität nicht ausreichend um den Zelltod ohne die anschließende Reperfusion zu verursachen.

Die molekularen Mechanismen hinter dem letalen myokardialen Reperfusionsschaden sind komplex und in großen Teilen noch unvollständig verstanden. Ansätze zur Erklärung und Therapie der Pathologie verfolgen dabei grundsätzlich zwei Richtungen: Den Einfluss der Reperfusion zum einen auf das Myokard und zum anderen auf die koronare Zirkulation, sollten dabei jedoch stets in ihrer Wechselwirkung aufeinander betrachtet werden.

1.2.1 Einfluss der Reperfusion auf das Myokard

Die abrupte Revaskularisation des Myokards nach einer Episode der Ischämie führt auf Ebene der Kardiomyozyten zu grundlegenden biochemischen und metabolischen Veränderungen.

1. Sauerstoffparadox

Die Reoxygenierung des Myokards nach einer Phase der prolongierten Ischämie führt zur exzessiven Bildung von hoch reaktiven freien Sauerstoffradikalen (ROS) [94]. Der dadurch ausgelöste oxidative Stress kann einen akuten myokardialen Zellschaden verursachen, welcher weit über den durch die Ischämie verursachten Zellschaden hinausreicht [31]. Diese Beobachtung wird als Sauerstoffparadox bezeichnet.

Es werden grundsätzlich drei Hauptquellen für die Entstehung der Radikale während der Reperfusion beschrieben: (1) Xanthinoxidase, primär von endothelialen Zellen, (2) Atmungskette während der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, primär von Myozyten und (3) NADPH Oxidase von infiltrierenden inflammatorischen Leukozyten, primär von Neutrophilen Granulozyten [95].

Einleitung

Die dadurch verursachten Schädigungsmechanismen umfassen die Peroxidation und Denaturierung sarkolemmaler Phospholipide, die Beeinträchtigung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Aufnahme durch Inhibition der Ca^{2+} -ATPase SERCA, Hemmung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und direkte strukturelle Schädigung zytoskelettaler Bestandteile [96, 97].

Darüber hinaus wird durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies die Chemotaxis von Leukozyten und damit eine inflammatorische Umgebungsreaktion gefördert [95]. Gleichzeitig reduzieren Oxidanzien die Bioverfügbarkeit und Biosynthese des intrazellulären Signalmoleküls Stickstoffmonoxid (NO) und antagonisieren dessen kardioprotektiven Effekt, darunter die Inaktivierung von Superoxidradikalen, die Dilatation der koronaren Vaskulatur und schließlich die Inhibition der Akkumulation von Neutrophilen in der Akutphase der postischämischen Inflammation [31].

2. Calciumparadox

Die Wiederaufnahme der aeroben mitochondrialen Stoffwechselfvorgänge durch die Reoxygenierung des Myokards selbst hat einen strukturellen Myokardschaden zur Folge, der über eine myofibrilläre Hyperkontraktur und Störung der sarkolemmalen Integrität zum kardiomyozytären Zelltod führt [93]. Dieses Phänomen wird als Calciumparadox bezeichnet.

Die Ursache für dieses Phänomen lässt sich in dem Membranpotential der Kardiomyozyten finden. Während der Ischämie entsteht ein Mangel an den für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials notwendigen Energiereserven, in dessen Folge Na^+ und Ca^{2+} ihrem elektrochemischen Gradienten folgend im Zytosol akkumulieren.

Dieser Überschuss an Kationen kann erst sukzessiv wieder durch die erneute Bereitstellung von energiereichen Substraten im Rahmen der Reperfusion durch die Ca^{2+} -ATPase SERCA des sarkoplasmatischen Retikulums und die Na^+/K^+ -ATPase des Sarkolemm ausgeglichen werden. Während SERCA den Transport von Ca^{2+} Ionen aus dem Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum katalysiert, ist die Wiederherstellung des nach intrazellulär gerichteten Na^+ Konzentrationsgradienten durch die Na^+/K^+ -ATPase notwendige Voraussetzung für den extrazellulären Export von Ca^{2+} Ionen durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter [98].

Kommt es nun in dieser kritischen Phase der transient erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch den Reperfusionsvorgang zusätzlich zur Bereitstellung energiereicher Substrate an die myofibrillären Elemente der kardialen Muskelzelle, erfolgt eine unkontrollierte Hyperkontraktion die durch Deformation der zytoskelettalen Bestandteile über das physiologische Maß hinaus zur irreversiblen mechanischen Schädigung und Nekrose führt [93].

3. pH-Paradox

Die schnelle Normalisierung des zytosolischen pH-Wertes zu physiologischen Werten im Rahmen der Reperfusion verstärkt die reaktive Hyperkontraktur des Myokards und damit den irreversiblen Zellschaden. Dieses Phänomen wird als pH-Paradox bezeichnet [31].

Einleitung

Nach einer Phase der prolongierten Ischämie weisen sowohl der Intrazellularraum der Kardiomyozyten als auch das Interstitium signifikant reduzierte pH-Werte in Folge des anaeroben Stoffwechsels und der damit einhergehenden Lactatakkumulation auf. Kommt es nun durch die schnelle Reperfusion zunächst zur Normalisierung des pH-Wertes im Extrazellularraum, entsteht ein H^+ -Protonengradient zwischen Intra- und Extrazellularraum, welcher u.a. durch Na^+/H^+ -Antiporter und Na^+/HCO_3^- -Symporter rasch ausgeglichen wird.

Der schnelle Ausgleich der intrazellulären Azidose führt dabei zur verstärkten Responsivität der myofibrillären Strukturelemente des Kardiomyozyten. Gleichzeitig führt der durch den Na^+/H^+ -Antiporter verursachte intrazellulärer Na^+ -Anstieg zu Kompensationsmechanismen, welche sekundär über den Na^+/Ca^{2+} -Antiporter einen zytoplasmatischen Ca^{2+} -Anstieg zur Folge haben und damit die Hyperkontraktur und myokardialen Zelltod verstärken [93].

4. Osmolarität

Während des Reperfusionvorganges entsteht in Folge der zytoplasmatischen Akkumulation anaerober Stoffwechselprodukte entlang der semipermeablen Membran des Sakolemmes ein nach intrazellulär gerichteter osmotischer Gradient, welcher zur progredienten Aufnahme freier Flüssigkeit und sukzessiven ödematösen Zellschwellung des Kardiomyozyten führt. Der dadurch induzierte mechanische Stress akzeleriert in Kombination mit der reaktiven Hyperkontraktur und prolongierten Sauerstoff- und Substratdepletion den myokardialen Zelltod [99].

1.2.2 Einfluss der Reperfusion auf die koronare Zirkulation

Die koronare Zirkulation nimmt eine Sonderstellung in der Pathogenese des myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschadens ein. Zum einen stellt sie den Hauptschauplatz der zur Ischämie führenden Krankheitsprozesse dar, zum anderen ist sie gleichzeitig auch selber von den Auswirkungen des myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschadens betroffen [100].

Der Erfolg einer primären perkutanen Koronarintervention (PCI) ist daher wesentlich abhängig von der funktionellen und strukturellen Integrität der koronaren Mikrozirkulation. Aktuelle Schätzungen zu Folge sind bis zu der Hälfte aller Patienten mit primär erfolgreicher Koronarintervention von den Folgen einer koronaren mikrovaskulären Dysfunktion und Obstruktion (CMVO) betroffen [101]. Die CMVO ist dabei das Resultat aus Ischämie- und Reperfusionsschaden, distaler koronarer Mikroembolisation und individueller Prädisposition der koronaren Mikrozirkulation zur endothelialen Dysfunktion [102, 103].

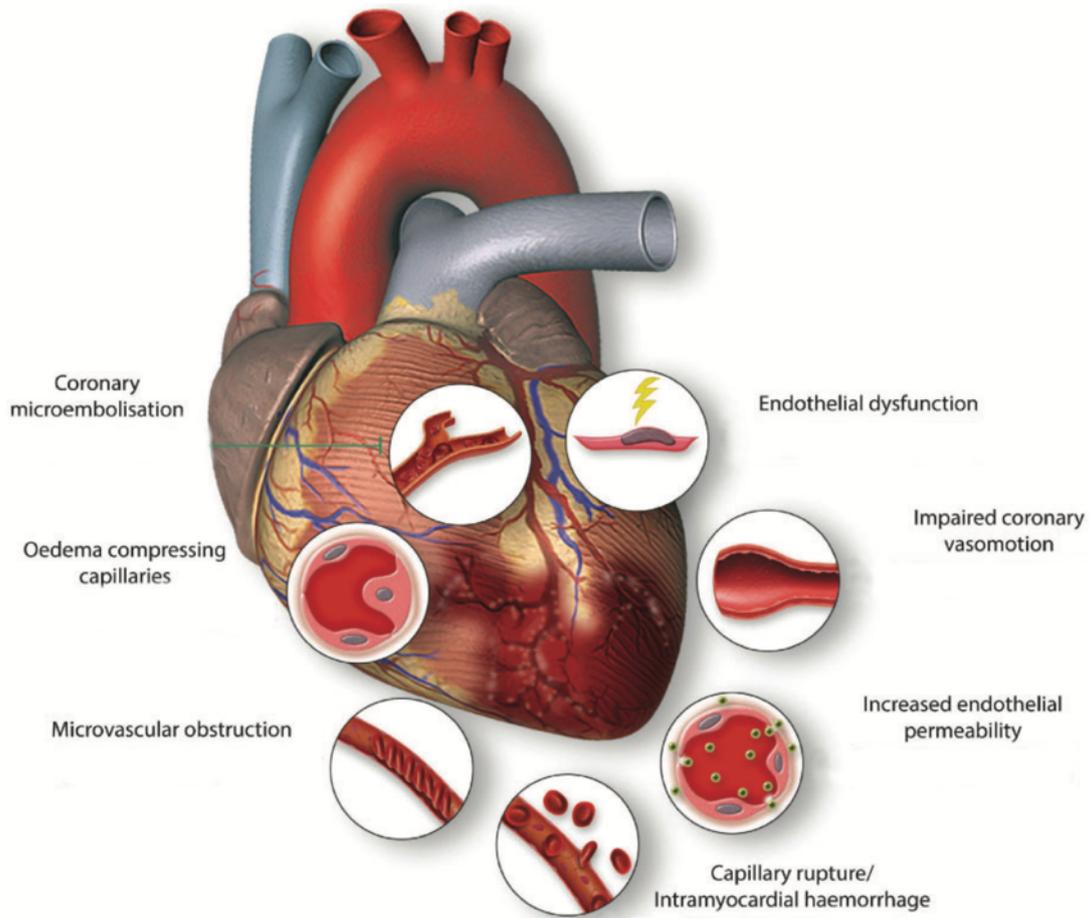


Abbildung 4: Schematische Übersicht der vielfältigen Einflüsse der Reperfusion auf die koronare Zirkulation
Quelle: *Cardiovasc Res.* (2019), Hausenloy et al. [15] (Modifiziert)

Dabei exponiert die Wiederherstellung der koronaren Perfusionsverhältnisse die distal der Gefäßstenose lokalisierte koronare Mikrozirkulation gegenüber Mikroembolisationen mit atherothrombotisch aktiven Bestandteilen aus dem Bereich der „Culprit Lesion“ [104-106], sowie zahlreichen vasokonstriktiven prothrombotischen sowie proinflammatorischen Mediatoren, darunter Serotonin, Thromboxan A₂ und TNF- α [15, 107].

Während koronare Endothelzellen relativ resistent gegenüber Ischämie sind und *in vitro* hypoxische Bedingungen über mehrere Tage überstehen können [108], führt *in vivo* die Unterbrechung des antegraden pulsatilen Blutflusses und der mechanischen Scherspannung im Koronargefäß zu einer veränderten Vasomotion mit Schwellung und sukzessiven Destruktion des endothelialen Zellverbandes [15, 109]. Die Initiierung des endothelialen Zelltods ist dabei wesentlich von der Aktivierung des NLRP3 Inflammosoms abhängig [110].

Analog zu der bereits in den Kardiomyozyten beschriebenen und durch die Reperfusion induzierten gestörten Calcium-Homöostase führt auch in den Endothelzellen eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration zu einer Aktivierung endothelialer kontraktile Elemente des Zytoskeletts [111]. Die dadurch verursachte Kontraktion erhöht die endotheliale Permeabilität des Koronargefäßes und führt zur Extravasation zellulärer Blutbestandteile in das reperfundierte Myokard und damit schließlich zur Ausprägung einer intramyokardialen Hämorrhagie (IMH). Die IMH tritt dabei in bis zu 40% der Patienten mit CMVO auf und ist mit

Einleitung

einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert als bei Patienten mit CMVO ohne IMH [101, 112].

Gleichzeitig destabilisieren die im Rahmen der myokardialen Inflammation freigesetzten Zytokine die endothelialen Zellkontakte zusätzlich durch Aktivierung der Tyrosinkinase Src und Dissoziation des VEGFR-2 Komplexes und führen schließlich über unterschiedliche Mechanismen zu einem ausgeprägten myokardialen Ödem, das sekundär in der Kompression weiterer KapillargefäÙe resultiert und dadurch erneute Ischämien provoziert [15, 113-115].

Die Aktivierung von Endothelzellen und Thrombozyten im Rahmen der myokardialen Ischämie und Reperfusion führt zur Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen und stellt die Grundlage für die Adhäsion von Thrombozyten sowie Thrombozyten-Leukozyten-Koaggregaten im Bereich der koronaren Mikrovaskulatur dar [116]. Die Adhäsion von Thrombozyten und inflammatorischen Zellen sowie auch die Ausprägung des interstitiellen myokardialen Ödems wird durch die Degradation der endothelialen Glykokalix weiter verstärkt [117-119].

Schließlich führt das Zusammenspiel aus endothelialer Inflammation und freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren aus der myokardialen Nekrose zur Rekrutierung weiterer inflammatorischer Zellen und Freisetzung zusätzlicher proinflammatorischer Mediatoren, darunter VEGF [120], Matrixmetalloproteinasen, Thrombin, Myeloperoxidasen [121] sowie Plättchenaktivierender Faktor [15, 122].

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Thromboinflammation sowie die biphasische Rolle der Thrombozyten in der myokardialen Ischämie/ Reperfusion werden in folgendem Kapitel in Detail beleuchtet.

1.3 Die Rolle von Thrombozyten in der Pathogenese der myokardialen I/R

Bei Thrombozyten handelt es sich um anukleäre diskoide Zellen von ca. 1,5 – 3,0µm Durchmesser, die nach heutigem Verständnis weit über ihre klassische Rolle in der Hämostase und Thrombose [123] hinaus eine grundlegende Bedeutung in zahlreichen Prozessen wie der Inflammation, Angiogenese, Regeneration und Metastasierung einnehmen [124-127].

Thrombozyten stellen die erste Immunzellpopulation dar, die nach akutem Myokardinfarkt das reperfundierte Myokard infiltrieren und dort im extravaskulären Raum mit kolokalisierten Leukozyten interagieren [128, 129]. Sie nehmen damit eine zentrale und außerordentlich wichtige Funktion in der Weichenstellung der darauffolgenden inflammatorischen sowie strukturellen Umbauvorgänge im Herzen ein [130, 131].

Nach heutigem Verständnis haben Thrombozyten in den komplexen Vorgängen der myokardialen Ischämie und Reperfusion eine biphasische Rolle, indem sie primär durch die Rekrutierung von vor allem Neutrophilen Granulozyten und Monozyten/ Makrophagen die initiale Immunantwort verstärken, sekundär jedoch durch die Freisetzung zahlreicher Mediatoren die Auflösung der Immunantwort und damit reparative Vorgänge aktiv unterstützen [15].

Die funktionelle Heterogenität von Thrombozyten

Der Schlüssel zu ihrer funktionellen Heterogenität und Funktion als Immunzellen findet sich dabei in der Expression von zahlreichen oberflächlichen Membranrezeptoren sowie ihrem umfangreichen Repertoire an potenten Biomolekülen, über das sie durch autokrine und parakrine Mechanismen als auch vesikulären Transportvorgängen über den Austausch von thrombozytären Mikropartikeln (PMPs) und Exosomen mit ihrer zellulären Umgebung kommunizieren können [130].

Thrombozyten verfügen über mehr als 300 verschiedene Proteine einschließlich Chemokine (z.B. PF4, SDF-1), Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, TGF- β), Zelladhäsionsmoleküle (z.B. vWF, CD62P, GPIIb/IIIa), Nukleotide (z.B. ATP) und Neurotransmitter (z.B. Serotonin, Histamin), die intrazellulär in drei unterschiedlichen Klassen von Sekretgranula (α -Granula, Lysosomen und elektronendichte Kerngranula) lokalisiert und essentiell für die Ausübung grundlegender Plättchenfunktionen wie der Thrombozytenaggregation, Thrombusformation und Blutgerinnung sind [132]. Gleichzeitig kommt diesen Mediatoren eine grundlegende Bedeutung in zahlreichen interzellulären Vorgängen in der Mikroumgebung des Thrombozyten, sowie der Rekrutierung von Immunzellen und terminaler Differenzierung von Vorläuferzellen zuteil [133].

Darüber hinaus ist besonders in den letzten Jahren das Bewusstsein dafür gereift, dass sich die funktionelle Vielfalt von Thrombozyten weit über die Ebene des Proteoms hinaus auf Ebene des Transkriptoms, Metaboloms und Lipidoms manifestiert und deren Bedeutung für die Vorgänge der Thromboinflammation in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses geraten [134-137]. Auf funktionelle Bedeutung des Transkriptoms, insbesondere auf den interzellulären vesikulären Austausch und das regulative Potential nicht-kodierende RNAs einschließlich thrombozytärer miRNAs, wird im Detail im Kapitel 1.4.1 sowie der Diskussion eingegangen.

Die Rolle von Thrombozyten in der myokardialen Inflammation und Reparatur

Nach einer Phase der akuten myokardialen Ischämie und Reperfusion durchläuft das Herz in den ersten drei bis vier Tagen (Mausmodell) eine robuste Immunantwort, in der es im Myokard zur Hochregulation zahlreicher proinflammatorischer Gene und Infiltration von Immunzellen in den interstitiellen Raum zur Phagozytose und Beseitigung der geschädigten myokardialen Zellen kommt [52].

Die Rekrutierung, transendotheliale Migration und Aktivierung der Immunzellen, darunter vor allem Neutrophile Granulozyten und Monozyten, wird dabei durch sekretierte thrombozytäre Chemokine (z.B. CXCL4, CCL5), Serotonin sowie durch die direkte Interaktion mit auf der thrombozytären Oberfläche exprimierten Membranproteinen (z.B. P-Selektin/CD62P, GPIb α) unterstützt [138-140]. Experimentellen Studien zu Folge ist eine signifikante Thrombozyten-Leukozyten Konjugation im peripheren Blut sowie die Kolo-kalisation von Thrombozyten und zirkulierenden Immunzellen im geschädigten Myokard ab sechs Stunden nach Beginn des akuten Myokardinfarktes nachweisbar [129]. Thrombozyten könnten dabei in Form von Koaggregaten mit den migrierenden Leukozytenpopulationen in das Myokard einwandern, gleichzeitig aber auch als Folge der intramuralen Hämorrhagie und erhöhten vaskulären Permeabilität im Myokard akkumulieren [141, 142]. Darüber hinaus verfügen Thrombozyten

Einleitung

neueren Erkenntnissen zu Folge über eine eigene migratorische Kapazität, die ihnen die selbstständige transendotheliale Migration in den interstitiellen Raum des Myokards ermöglicht [143].

Thrombozyten tragen in dieser initialen Phase analog zu anderen entzündlichen Krankheitsmodellen wie der Atherosklerose aktiv zu einer exzessiven inflammatorischen Reaktion im Myokard bei und könnten dadurch einen zusätzlichen myokardialen Zellschaden und Dysfunktion, eine vergrößerte Infarktfläche sowie ein nachteiliges myokardiales Remodeling induzieren [130, 144].

In der Tat konnte in Studien eine Exazerbation des myokardialen Ischämie-/ Reperfusionsschadens durch die Formation von Komplexen aus Thrombozyten und Neutrophilen nachgewiesen werden [145, 146]. Zusätzlich können durch Thrombin aktivierte Thrombozyten über P-Selektin/CD62P die Freisetzung sog. Neutrophiler Extrazellulärer Traps (*engl.* NETs) auslösen und damit einen zentralen Entzündungsmechanismus des Immunsystems initiieren, der weitere prothrombotische sowie proinflammatorische Signalkaskaden anstößt und dadurch maßgeblich die Prognose der koronaren Herzerkrankung beeinflusst [147-149].

Auf der anderen Seite ist eine kontrollierte initiale und akute Phase der Inflammation essentiell zur Wiederherstellung der myokardialen Gewebshomöostase. So konnten einige Studien eine verschlechterte kardiale Funktion, verstärkte Fibrosierung sowie Entwicklung einer progressiven Herzinsuffizienz nach artifizieller Depletion von Neutrophilen Granulozyten in Folge eines Myokardinfarktes nachweisen [75, 130].

Nach dieser akuten Phase der initialen Immunantwort ist Auflösung der primären Inflammationskaskade ausschlaggebend, um die reparative Phase und damit essentielle strukturelle Umbauprozesse des Herzens im Rahmen des myokardialen Remodelings einzuleiten. Die phänotypische Differenzierung von residenten und aus monozytären Vorläuferzellen entstandenen proinflammatorischen M1 Makrophagen in den reparativen M2 Makrophagenstatus spielt dabei eine ganz zentrale Rolle [52].

Thrombozyten sind in der Lage, aktiv die Polarisation von M1/ M2 Makrophagen durch Freisetzung von sowohl proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- α / IL-6) als auch antiinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-10) in die eine, als auch die andere Richtung zu induzieren [150, 151].

Darüber hinaus können Thrombozyten durch die granuläre Freisetzung zahlreicher parakriner Mediatoren einschließlich Lipoxin A4, Maresin 1 und Annexin A1 über Interaktion mit Neutrophilen Granulozyten die Auflösung der initialen proinflammatorischen Immunantwort unterstützen [130, 152, 153]. Während Lipoxin A4 und Annexin A1 die proinflammatorische Immunantwort nach Ischämie und Reperfusion durch Aktivierung des Fpr2/2 Rezeptors auf Neutrophilen Granulozyten unterdrückt [154], kann Maresin 1 eine reparative Immunantwort durch Unterdrückung der thrombozytären Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren induzieren [155].

Die Bedeutung von Thrombozyten für die Orchestrierung, Koordination und Modulation von inflammatorischen Vorgängen wird umso eindrücklicher durch die Erkenntnisse aus

Einleitung

zahlreichen Krankheitsmodellen, in denen sich in der Abwesenheit von Blutplättchen erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen zeigten [130, 156, 157].

Eine vielversprechende therapeutische Perspektive, die während des akuten Myokardinfarkts irreversibel geschädigten Kardiomyozyten zu ersetzen, stellt die Differenzierung von kardialen Progenitorzellen zu funktionellen Kardiomyozyten dar. Thrombozyten verfügen über zahlreiche Mediatoren (z.B. SDF-1 α) in ihren α -Granula, die ihnen die Mobilisierung als auch Transdifferenzierung von Progenitorzellen ermöglicht und damit ein Schlüssel für die Entwicklung zukünftiger kardioregenerativer Therapiestrategien darstellen könnte [133, 158].

Die Rolle von Thrombozyten in der Modulation von kardialen Fibroblasten

Nach einem akuten Myokardinfarkt haben kardiale Fibroblasten eine zentrale Funktion in der Organisation der extrazellulären Matrix und tragen damit essentiell zur strukturellen sowie funktionellen Integrität des geschädigten Myokards bei [159]. Insbesondere die prolongierte Aktivierung von kardialen Fibroblasten führt potentiell zur exzessiven kardialen Fibrose und birgt die Gefahr eines nachteiligen myokardialen Remodelings, das weit über das Gebiet des ursprünglichen Infarktes hinausreicht [160].

Thrombozyten verfügen über zahlreiche granuläre Mediatoren, einschließlich Serotonin, TGF- β_1 und PDGF, mit denen sie kardiale Fibroblasten aktivieren sowie deren Expansion und Transdifferenzierung zu Myofibroblasten induzieren können [161, 162]. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass unter transverser Aortenkonstriktion und kardialer Drucküberlastung der Plasma TGF- β_1 -Spiegel abhängig von der granulären Freisetzung aus Thrombozyten ansteigt und zur kardialen Hypertrophie, Fibrose und systolischen Dysfunktion beiträgt [163]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass aus thrombozytären α -Granula stammenden Thrombospondin-1 (TSP-1) negativ die Myofibroblastendichte und Expansion in nicht infarzierte Myokardareale reguliert sowie eine prolongierte postischämische Inflamationsreaktion supprimiert [164, 165].

Die Rolle von Thrombozyten in der Modulation von Kardiomyozyten

Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass Thrombozyten auch über ihre Rolle in der okklusiven Koronarthrombose und Inflammation hinweg direkt Einfluss auf Physiologie und Funktion von Kardiomyozyten nehmen können [130]. So sind für zahlreiche Mediatoren (z.B. ADP/ ATP, Histamin, Serotonin) aus den elektronendichten Kerngranula von Thrombozyten sowie Thromboxan A₂ positiv inotrope Effekte auf Kardiomyozyten beschrieben [166], auch wenn deren klinische Relevanz noch zweifelhaft ist [167]. Interessanterweise konnten mehrere Studien Thrombozyten nach myokardialer Ischämie und Reperfusion mit der Inzidenz von Herzrhythmusstörungen wie dem Kammerflimmern ursächlich in Verbindung bringen [168, 169]. Zahlreiche Studien konnten einen direkten bzw. indirekten kardioprotektiven Effekt von aktiv sezernierten thrombozytären Mediatoren wie der Nukleinbase Adenin, Serotonin, Thromboxan A₂, SDF-1 α und TGF- β_1 nach myokardialer Ischämie und Reperfusion demonstrieren [170-173].

Die Rolle von Thrombozyten in der Regulation von Angiogenese

Einleitung

Die geringe Größe von Blutplättchen in Kombination mit den spezifischen rheologischen Fließeigenschaften von Blut führen dazu, dass Thrombozyten durch größere Blutzellen im laminaren Blutfluss an die Gefäßwand gedrängt werden und damit im engen räumlichen Kontakt zum Endothel stehen. Diese besondere Eigenschaft könnte eine wichtige Voraussetzung dafür sein, welche Thrombozyten die permanente Interaktion mit dem Endothel und damit die Möglichkeit zur Modulation der Angiogenese bietet [174].

Tatsächlich sind Thrombozyten nach Stimulation mit unterschiedlichen Agonisten durch ADP und Thromboxan A₂ zur differentiellen granulären Freisetzung von sowohl pro- als auch anti-angiogenen Mediatoren (z.B. VEGF, SDF1 α) in der Lage [174] und steuern über auf ihrer Oberfläche exprimierte Membranrezeptoren (z.B. C5a Rezeptor 1) die Neovaskularisation [175].

1.4 MicroRNAs: Biogenese, Mechanismen und Funktion

Bei microRNAs (miRNAs) handelt es sich um eine endogene Gruppe kleiner nichtkodierender RNAs mit einer Länge von ca. 19 – 24 Nukleotiden (nt), die ungeachtet ihrer geringen Größe eine zentrale Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression spielen [23, 176].

MiRNAs sind in ihrer sequenzspezifischen Abfolge und ihrem Expressionsmuster hoch variabel, evolutionär über einen Großteil der Eukaryoten einschließlich dem Menschen ubiquitär verbreitet und in der Lage nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung mRNA (messenger RNA) spezifisch zu binden um deren endonukleolytische Spaltung bzw. gezielte Destabilisierung und translationale Repression herbeizuführen.

Ungeachtet ihrer erst kürzlichen Entdeckung und strukturellen Aufklärung zu Beginn des 21. Jahrhunderts stellen miRNAs eine der größten bisher bekannten genregulatorischen Klassen in multizellulären Organismen dar, die Schätzungen zu Folge mit einem Anteil von 1-2% am humanen Genom an der Regulation von bis zu 60% der Protein-Kodierenden Genen beteiligt sind [17, 177-179].

Sie nehmen damit eine Schlüsselrolle und grundlegende koordinative Aufgabe in einem komplexen regulatorischen Netzwerk ein, das zentral an der Steuerung essentieller zellulärer Mechanismen wie der Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Regeneration beteiligt ist und in dem in Zukunft der Schlüssel zu einem modernen Verständnis zahlreicher pathophysiologischer Krankheitsprozesse liegen wird [23, 180].

A) Biogenese von miRNAs

Einleitung

Im Folgenden werden die Mechanismen beschrieben, die über eine koordinierte Abfolge von chronologisch aufeinander abgestimmten Prozessen zur Biogenese der miRNA führen.

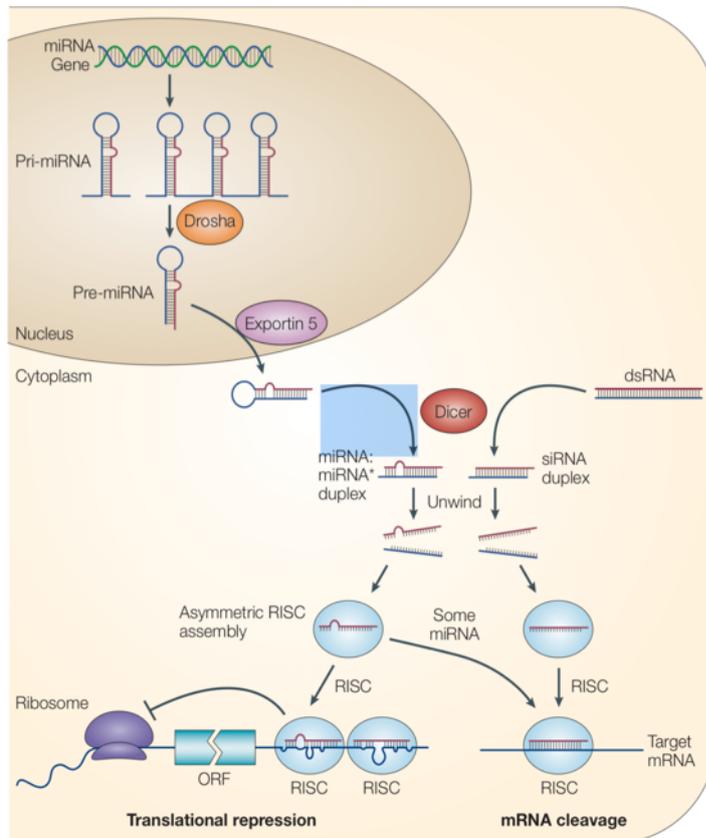


Abbildung 5: Biogenese und Funktion von miRNAs
Mechanismus der posttranskriptionellen Regulation
Quelle: *Nat Rev Genet.* (2004) He and Hannon [23]

Ein Großteil der genomischen Information von miRNAs findet sich in phylogenetisch stark konservierten intergenen oder intronischen Regionen sowie in unmittelbarer Nähe zu anderen für miRNAs kodierende Sequenzen [180]. Nach aktuellem Verständnis wird dabei ein nicht unerheblicher Anteil der Genexpression in Form von miRNA Clustern über polycystronische Transkriptionseinheiten reguliert und steht unter der transkriptionellen Kontrolle eigenständiger Promoter [17, 181, 182].

Das aktuelle Model zur Biogenese von miRNAs basiert dabei auf zwei grundlegenden Beobachtungen (Abb.: 5) [17]: Erstens, miRNAs werden sequentiell zunächst als lange primary miRNAs (pri-miRNAs) transkribiert, die anschließend über intermediäre precursor miRNAs (pre-miRNAs) in die abschließende reife miRNA Form prozessiert werden. Zweitens, die zugrundeliegenden enzymatischen Prozesse sind dabei streng kompartimentiert und finden zunächst im Nucleus und anschließend im Zytoplasma statt, sodass für die Entstehung der reifen miRNAs der aktive nukleäre Export der pre-miRNA notwendig wird [183, 184].

Die Biogenese der miRNA beginnt mit der Transkription im Nucleus der Zelle durch die RNA Polymerase II [185]. Dabei entsteht eine mehrere Kilobasen lange doppelsträngige primary miRNA (pri-miRNA), die über eine lokale Haarnadelstruktur mit sekundärer Stamm-Schleifen-Konformation verfügt und deren Enden durch einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende und in den meisten Fällen zusätzlich durch eine 5'-Cap-Struktur am 5'-Ende flankiert werden.

Nukleäre Prozessierung durch Droscha:

Einleitung

Die pri-miRNA wird anschließend von dem nukleären Mikroprozessor-Komplex, bestehend aus der RNase-III Drosha und dem RNA bindenden Kofaktor DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 (DGCR8) Protein, unter Erhalt der Haarnadelstruktur gespalten und als 60-70 nt lange doppelsträngige pre-miRNA freigesetzt [186, 187].

Bei Drosha handelt es sich dabei um ein großes Protein von ca. 160 kDa, das aus einem von zwei tandem RNase III Domänen (RIIDs) gebildeten katalytischen Zentrum und einer Doppel-Strang RNA-bindenden Domäne (dsRBD) besteht (Abb.: 6) [188, 189]. Die Substratspezifität und Effektivität der Substratumsetzung sind dabei maßgeblich abhängig von der Tertiärstruktur der pri-miRNA, der terminalen Schleifengröße, der Stamm-Struktur sowie den flankierenden Sequenzen im Bereich der Schnittstelle der pri-miRNA [190-192].

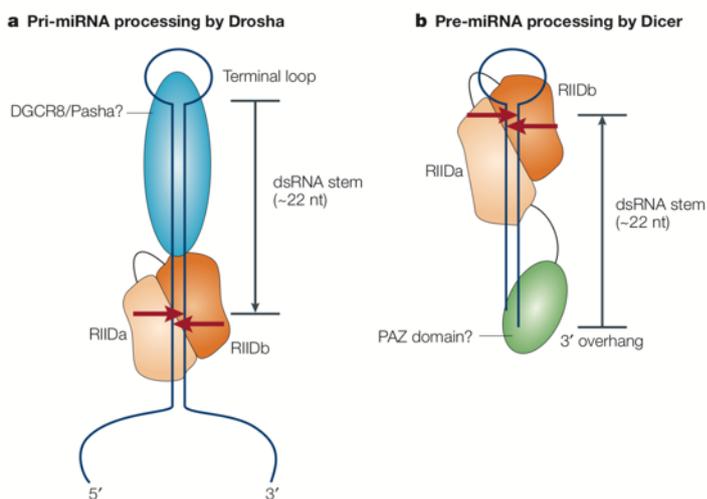


Abbildung 6: Struktureller Aufbau von Drosha und Dicer

Quelle: *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2005) Kim [17]

Anschließend erfolgt der aktive nukleäre Export der pre-miRNAs über den Kernporen-Komplex der nukleären Membran in das Zytoplasma der Zelle. Dieser Transportvorgang wird von dem Enzym Exportin-5 und unter Hydrolyse des an den Kofaktor Ran gebundenen GTP katalysiert [193].

Zytoplasmatische Prozessierung durch Dicer:

Im Zytoplasma angekommen, wird die pre-miRNA von dem RNase-III-Enzym Dicer und in Interaktion mit dem Kofaktor TRBP2 unter Abspaltung der Stamm-Schleifen-Struktur in die 19-24 nt lange doppelsträngige miRNA Duplex (miRNA:miRNA*) überführt. Dieses intermediäre Zwischenprodukt besteht aus der reifen miRNA und der dazu imperfekt komplementären miRNA* [194, 195]. Bei TRBP2 (Transactivation Response Element RNA-Binding Protein 2) handelt es sich dabei um einen integralen Kofaktor des Dicer-Komplexes, der neben der positiven Beeinflussung der RNA-Bindungsaffinität und Steigerung der Präzision der Endoribonuklease durch eine Präselektionierung der RNA insbesondere die effiziente Funktion von Dicer auch bei hohem Substratangebot sicherstellt [196, 197].

Der Enzymkomplex Dicer stellt eine evolutionär hoch konservierte Endoribonuklease von ca. 200 kDa mit zentraler Schlüsselfunktion in der miRNA Biogenese dar [17], dessen genetische Deletion in experimentellen Studien zur Akkumulation von pre-miRNAs und Reduktion von reifer miRNA führt [198]. Neben seiner zentralen Bedeutung in der Prozessierung von miRNA

Einleitung

wurde Dicer ursprünglich erstmalig im Zusammenhang mit der Entdeckung des Mechanismus der RNA-Interferenz für seine essentielle Rolle in der Generierung von siRNA (*engl.* small interfering RNA) und damit seiner grundlegenden Bedeutung für den natürlichen Mechanismus des posttranskriptionellen Gen-Silencings beschrieben [194, 199].

Strukturell stellt Dicer einen multimeren katalytisch aktiven Protein-Komplex dar, der aus einer Helikase, einer DUF283 Domäne (Domain of Unknown Function), einer PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) Domäne sowie zwei tandem RNase-III Domänen und einer Doppelstrang-RNA-bindenden Domäne (dsRBD) besteht (Abb.: 6). Während das katalytisch aktive Zentrum zur Bindung und Spaltung des Substrates von den RNase-III Domänen und der dsRBD Domäne gebildet wird, erfolgt die Diskrimination zwischen miRNA und siRNA über die Interaktion mit der Haarnadelstruktur durch die Helikase [200]. Die PAZ Domäne spielt dabei eine wichtige Rolle in der Erkennung des bei der Prozessierung durch Drosha entstandenen 3'-Endes der pre-miRNA, während die DUF283 Domäne neueren Erkenntnissen zu Folge eine wichtige Bedeutung in der Hybridisierung und Ausbildung komplementärer Basenpaarung zu Teil kommt [195, 201].

Formation des miRISC Effektorkomplexes:

Die Strangselektion und damit die spezifische Auswahl des miRNA Leitstranges, auf dessen Grundlage die posttranskriptionelle Genregulation stattfindet, erfolgt schließlich unter Assoziation des Dicer-Komplexes mit dem Ago2 Protein (Argonaute 2). Die Selektion des Leitstranges findet dabei auf Grundlage der thermodynamischen Eigenschaften der miRNA:miRNA*-Duplex statt und führt über eine Abfolge von mehreren Schritten zur Formation des als miRISC (miRNA-Containing-RNA-Induced-Silencing-Complex) bezeichneten Effektorkomplex/ Ribonukleoprotein-Komplex (RNP).

Dabei erfolgt selektiv die Inkorporation desjenigen miRNA Komplementärstranges mit der geringeren thermodynamischen Stabilität der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen am 5'-Ende in den miRISC Komplex, während der komplementäre Gegenstrang (miRNA*) abgebaut wird [202, 203]. Die präferentielle Auswahl des miRNA Komplementärstranges auf Grundlage seiner spezifischen thermodynamischen Eigenschaften und die asymmetrische Inkorporation nur eines Komplementärstranges der Duplex in den RISC Komplex determiniert somit die Spezifität für die spätere posttranskriptionelle Inhibition [202].

Das Ago2 Protein gehört der Familie der Argonautenproteine (AGO) an und stellt den integralen funktionellen Bestandteil des miRISC dar. Charakteristisches Merkmal dieser ca. 100 kDa großen Proteinfamilie sind die zwei funktionellen Proteindomänen PAZ und PIWI. Während die PAZ-Domäne analog zu der im Dicer-Enzym ausgeübten Funktion für die Registrierung und Auswahl des miRNA Leitstranges verantwortlich ist, ermöglicht die PIWI-Domäne durch seine Endonukleaseaktivität zusammen mit dem inkorporierten miRNA Leitstrang die sequenzspezifische Erkennung und Abbau von mRNA [176]

B) Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression

Der miRISC Effektorkomplex identifiziert die mRNA Transkripte des Zielgenes über die Ausbildung von komplementären Basenpaarungen mit dem inkorporierten miRNA Leitstrang und reguliert deren Expression auf posttranskriptioneller Ebene.

Einleitung

Der Mechanismus der posttranskriptionellen Regulation ist dabei abhängig von dem Grad der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA des Zielgenes und erfolgt entweder über Degradation der mRNA durch ihre direkte Spaltung oder über die gezielte Destabilisierung der mRNA und Inhibition ihrer Translation. Dabei spielt die gezielte Spaltung der mRNA Zieltranskripte durch miRNA im Menschen und anderen Säugetieren gegenüber der Destabilisierung und translationalen Repression eine deutlich untergeordnete Rolle [176, 204].

Mechanismus: mRNA- Endonukleolytische Spaltung

Mechanistische Voraussetzung für die miRNA-induzierte Spaltung von mRNA Transkripten des Zielgens ist neben der Assoziation mit einem funktionell aktiven Argonautenprotein ein ausreichend hohes Maß an Komplementarität über den gesamten Bereich der inkorporierten miRNA des miRISC Effektorkomplexes und der mRNA im Bereich der Bindungsregion.

Dabei formiert sich im Bereich der Bindungsregion geometrisch eine kontinuierliche A-Helix zwischen der mRNA und miRNA des miRISC, die sich über die gesamte Sequenz zwischen dem 2. bis zum 12. Nukleotid des 5'-Endes vom miRNA Leitstranges ausbilden können muss, um schließlich die endonukleolytische Spaltung der mRNA zwischen dem 10. und 11. Nukleotid einleiten zu können [205-207].

Nach der endonukleolytischen Spaltung der mRNA bleibt die miRNA intakt, um die effiziente Zielerkennung und Spaltung weiterer mRNAs herbeizuführen [208].

Während dieser Mechanismus vor allem in pflanzlichen Organismen vorkommt [209], beschränkt er sich aktuellen Erkenntnissen zu Folge aufgrund der hohen Anforderungen an die Komplementarität zwischen miRNA und mRNA im Menschen und anderen Säugetieren auf einen äußerst geringen Bruchteil zellulärer Transkripte, zirkulärer RNA und wenigen mRNAs viralen Ursprunges [204].

Mechanismus: mRNA- Destabilisierung & Translationale Repression

Der dominierende posttranskriptionelle Regulationsmodus der miRNA im Menschen und anderen Säugetieren basiert nicht auf dem Prinzip der endonukleolytischen Spaltung, sondern in erster Linie auf der gezielten Destabilisierung und translationalen Repression der mRNA [21, 177, 204].

Die Zielerkennung erfolgt dabei nicht durch die Komplementarität der mRNA über die gesamte Sequenz des miRNA Leitstranges, sondern Bedarf lediglich der Präsentation und Komplementarität eines kleineren ausgewählten und hoch-konservierten heptameren Sequenzbereiches (*engl.* Seed Region) von Nukleotid 2 - 8 am 5'-Ende der miRNA durch das Argonautprotein des miRISC Effektorkomplexes [177]. Dabei findet die miRNA gesteuerte Assoziation meist multipler kooperativ miteinanderarbeitender miRISC Effektorkomplexe bis auf wenige Ausnahmen im Bereich der 3'-End UTR (*engl.* Untranslated Region) der mRNA statt (Abb.: 7).

Einleitung

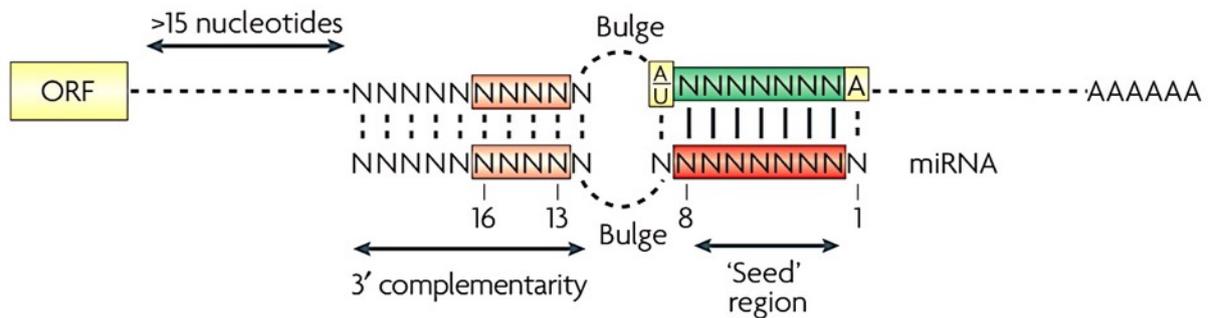


Abbildung 7: Prinzip der miRNA-mRNA Interaktion

Quelle: *Nat Rev Genet.* (2008) Filipowicz, Bhattacharyya [21]

Die Spezifität und Stabilität dieser Assoziation wird neben den aus der spezifischen Basenabfolge resultierenden thermodynamischen Eigenschaften in der Nähe der Bindungsregion zusätzlich von weiteren charakteristischen Sequenzeigenschaften beeinflusst [210]. Während eine perfekte Komplementarität zwischen miRNA und mRNA im Bereich der „Seed Region“ eine wichtige Grundvoraussetzung für das Zustandekommen der Assoziation des miRISC Komplexes darstellt, müssen hingegen im zentralen Bereich der miRNA-mRNA-Duplex obligatorisch Fehlpaarungen vorkommen um die Ago2-medierte endonukleolytische Spaltung der mRNA zu verhindern [21].

Darüber hinaus ist weiterhin ein angemessenes Maß an imperfekter Komplementarität im Bereich der 3'-Hälfte der miRNA außerhalb der „Seed Region“ erforderlich, um die Interaktion zwischen miRNA und mRNA weiter zu stabilisieren. Vereinzelt Fehlpaarungen werden in diesem Bereich in der Regel gut toleriert. Für den Fall einer suboptimalen Komplementarität im Bereich der „Seed Region“ kommt supplementären Bindungsregionen im Bereich der Nukleotidposition 13 -1 6 vom 5'-Ende der miRNA eine besondere Bedeutung in der Stabilisierung der Interaktion zwischen miRNA und mRNA zu teil [210].

Neueren Erkenntnissen aus genomweiten Studien zum Einfluss von miRNA auf das zelluläre mRNA und Proteinlevel als auch Untersuchungen auf Ebene des Ribosoms zu Folge macht dabei nicht, wie lange Zeit vermutet, die Inhibition der Translation, sondern vor allem die Destabilisierung der mRNA relativ betrachtet einen größeren Anteil an der Repression der Genexpression aus [211, 212].

Nach Bindung des miRISC Effektor-Komplexes im Bereich der 3'-End UTR der mRNA rekrutiert das Argonautenprotein AGO das Adapter Protein TNRC6 [16, 213-215]. TNRC6 spielt dabei eine Schlüsselfunktion als Mediator der Interaktion zwischen dem Argonautenprotein des miRISC und zentralen Proteinen der daraufhin initiierten Effektor-Kaskade. Zum einen interagiert TNRC6 mit dem am Poly-A-Schwanz des 3'-Endes der mRNA assoziierten PABPC (*engl.* Cytoplasmatic Poly(A)-Binding-Protein), zum anderen rekrutiert TNRC6 zahlreiche Deadenylase-Komplexe einschließlich dem PAN2-PAN3 und dem CCR4-NOT Komplex [16, 204].

Einleitung

Die Deadenynase-Komplexe kürzen daraufhin gezielt die Länge des Poly-A-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA durch ihre intrinsische Deadenylase-Aktivität. Die deadenylierte mRNA wird anschließend unter der Einwirkung weiterer Kofaktoren dekapitiert um schließlich in 5'-3'-Richtung exonukleolytisch abgebaut zu werden [216].

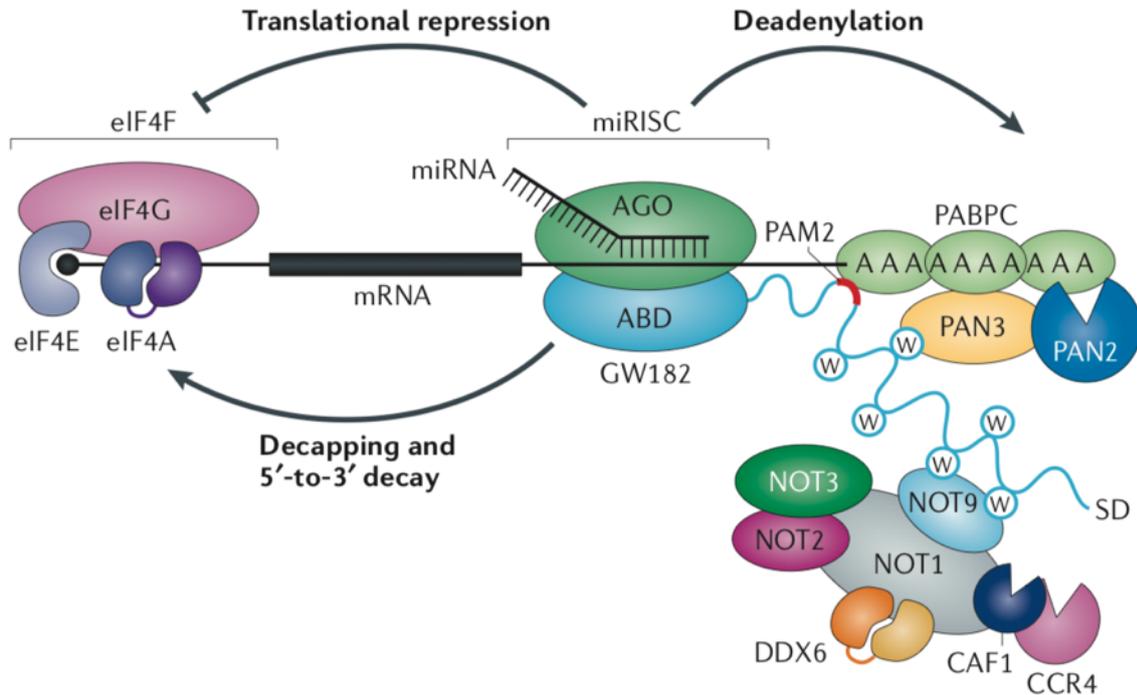


Abbildung 8: Mechanismus- miRNA Gen Silencing im Menschen

Quelle: *Nat Rev Genet.* (2015) Jonas and Izaurralde [16]

Neben den beschriebenen Prozessen, die zu gezielter mRNA-Degradation führen, ist TNRC6 darüber hinaus maßgeblich an der translationalen Repression der mRNA beteiligt. Demnach können miRNAs die Translation von mRNA in der Initiationsphase empfindlich stören, indem sie über Interaktion mit der von TNRC6 rekrutierten Helikase DDX6 (DEAD Box Protein 6) den Zusammenbau und die Aktivität des für die Translation notwendigen eIF4F-Komplexes (eng. Eukaryotic Initiation Factor 4F) negativ beeinflussen [16, 217].

Zellulärer Schauplatz dieser posttranskriptionellen Regulation der Genexpression sind die P-Bodies (engl. Processing Bodies) und Stress-Granula (engl. Stress Granules) [218]. Dabei handelt es sich um ausgewiesene zytoplasmatische Orte, in denen die targetierte mRNA nach aktiver Translokation räumlich getrennt von dem aktiven Translationsgeschehen der Zelle gespalten und abgebaut oder alternativ nach einer reversiblen Phase der Inhibition in Reaktion auf ein spezifisches zelluläres Signal der zellulären Translation wieder zurückgeführt werden kann [219].

Ausblick & Perspektiven:

Auch wenn viele Details des komplexen regulatorischen Netzwerkes, in dem miRNAs ihre Funktion ausüben, noch nicht vollumfänglich aufgeklärt sind, ergibt sich bereits jetzt ein sehr umfangreiches Bild an unterschiedlichen regulatorischen Mechanismen, über die miRNAs Einfluss auf die Expression ihrer Zielgene nehmen können.

Einleitung

Die Dimension und Dynamik des regulatorischen Einflusses von miRNAs wird umso deutlicher, wenn man sich vergegenwärtigt, dass jede einzelner der über 1000 bisher bekannten humanen miRNAs durchschnittlich 200 – 300 mRNAs regulieren [177].

Durch bereits geringfügige Abweichungen in der Biogenese von miRNAs können relevante Isoformen entstehen, die ein völlig neues Repertoire an mRNAs regulieren. So können unter bestimmten Umständen beide Komplementärstränge der miRNA-Duplex jeweils als Vorlage des miRISC Effektor-Komplexes dienen. Zusätzlich können durch die unpräzise Spaltung durch Drosha und Dicer abweichende und heterogene miRNA Sequenzen mit veränderter „Seed Region“ entstehen. Beides mit grundlegendem Einfluss auf die Zielerkennung [204].

Während miRNAs insbesondere für ihren negativen Einfluss auf die Genexpression bekannt sind, gibt es wenige Beispiele in denen miRNAs unter bestimmten Bedingungen auch die Translation von mRNAs verstärken können [220].

Neben dem bisher beschriebenen kanonischen Weg der miRNA Biogenese gibt es darüber hinaus zahlreiche alternative nicht-kanonische Prozessierungswege, die teilweise die Notwendigkeit einer Drosha- oder Dicer-abhängigen enzymatischen Spaltung umgehen und dadurch die Variabilität dieses regulatorischen Netzwerkes um eine zusätzliche Ebene erweitern [221, 222].

Der Handlungsspielraum von miRNAs ist dabei nicht, wie lange Zeit vermutet, auf das Zytoplasma beschränkt. So können einige miRNAs über aktive Transportmechanismen zurück in den Nucleus importiert werden um dort auf epigenetischer Ebene Einfluss auf die Aktivierung oder Inhibierung der Transkription ausgewählter Gene zu nehmen [223]

Vor allem in den letzten Jahren ist darüber hinaus die Beobachtung, dass miRNAs auch über den zellulären Horizont ihres Entstehungsortes hinaus durch Exozytose und vesikulären Transport gezielt zelluläre Funktionen in ihrer unmittelbaren Umgebung beeinflussen könnten, zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses geraten [224]. MiRNAs könnten dadurch zu einem wesentlichen Bestandteil der interzellulären Kommunikation werden.

1.4.1 Die Rolle von miRNAs in der Physiologie von Thrombozyten

Neben ihrer zentralen Bedeutung von Thrombozyten für die Prozesse der primären Hämostase im Bereich vaskulärer Läsionen und der Entstehung arterieller thrombotischer Verschlüsse, welche die pathophysiologischen Grundlagen des akuten Myokardinfarktes und des ischämischen Schlaganfalles darstellen, ist insbesondere durch zunehmende Erkenntnisse aus den letzten Jahren die herausragende Rolle von Thrombozyten bei der Regulation von Inflammation, zellulären Reparatur und Regeneration in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses geraten [125].

Thrombozyten: Transkriptom & Proteom

Trotz ihres fehlenden Zellkerns als Träger der genomischen Erbinformation und der daraus resultierenden fehlenden genetischen Voraussetzung zur Transkription nukleärer Gene, weisen Thrombozyten eine ausgesprochene metabolische Aktivität auf und verfügen neben Mitochondrien, Golgi-Apparat und sekretorischen Granula über zahlreiche weitere funktionelle

Einleitung

Organellen [225-227], wie einem rauen endoplasmatisches Retikulum als auch Ribosomen, welche sie zur aktiven Translation von mRNA und *de novo* Proteinbiosynthese befähigen [228-231].

In der Tat erhalten Thrombozyten im Rahmen ihrer Biogenese über zahlreiche Vorläuferstadien von ihren hämatologischen Ursprungszellen, den Megakaryozyten, ein ausgewähltes Repertoire an poly(A)⁺ RNA, welches die Grundlage ihrer Fähigkeit zur aktiven Proteinbiosynthese darstellt [232].

Mittlerweile konnten zahlreiche Studien nachweisen, dass Thrombozyten über ein ausgesprochen umfangreiches und diverses Transkriptom verfügen, das sie in die Lage versetzt, dynamisch innerhalb kürzester Zeit Proteinbiosynthese in Reaktion auf externe Umweltfaktoren zu betreiben, um ihren vielseitigen biologischen Funktionen nachzukommen [233-236]. So konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen über α IIb/ β 3 das intrazelluläre Startsignal für die Translation und damit der Biosynthese zahlreicher Proteine darstellt [233]. Interessanterweise findet auch eine gesteigerte Proteinbiosynthese von Cyclooxygenase-1 (COX-1) in Blutplättchen als Reaktion auf eine Stimulation mit Thrombin und Fibrinogen statt [234].

Darüber hinaus verfügen Thrombozyten zusätzlich über ein einzigartiges Spliceosom, ein Mechanismus der normalerweise nukleären Zellen vorbehalten ist. Nach Aktivierung spezifischer Oberflächenrezeptoren durch ihre Umwelt sind sie in der Lage, durch gezielte Exzision von intronischen Sequenzabschnitten ausgewählte pre-mRNA in reife mRNA zu überführen, um deren anschließende Translation in funktionelle Proteine zu ermöglichen [237]

Aktuellen Studien zufolge enthalten Thrombozyten bis zu 32% des humanen Genoms in Form von mRNA [238-240]. Neben Transkripten die für Proteine mit relevanter Bedeutung für grundlegende thrombozytäre Bestandteile wie dem Glykoprotein GPIIIa, Plättchenfaktor 4, β -Thromboglobulin, Aktin und α -Tubulin kodieren, zählen auch zahlreiche Zytokine mit zentraler Bedeutung für die Regulation inflammatorische Prozesse zu dem am stärksten exprimierten Transkripten [240]

Die Bedeutung thrombozytärer miRNA für die posttranskriptionelle Genregulation:

Thrombozyten stehen damit vor der einzigartigen Herausforderung: Auf der einen Seite interagieren sie in einer sich dynamisch verändernden Umwelt, die sie mit der permanenten Notwendigkeit konfrontiert kontinuierlich und flexibel zelluläre Anpassungsvorgänge vorzunehmen und Proteinbiosynthese zu betreiben. Auf der anderen Seite werden sie von ihren megakaryozytären Vorläuferzellen mit einem zwar umfangreichen aber zugleich limitierten Repertoire an mRNAs ausgestattet, mit dem sie effizient haushalten müssen um ihren vielseitige zellulären Funktionen nachkommen zu können.

Die Bewältigung dieser gewaltigen Aufgabe setzt notwendigerweise das Vorhandensein effizienter posttranskriptioneller Regulationsmechanismen voraus. Neben der bereits beschriebenen Fähigkeit zum Splicing könnte dabei insbesondere miRNAs eine bedeutende Rolle bei der Steuerung dieser regulativen Vorgänge zu Teil kommen.

Hinweise darauf lassen sich bereits bei Betrachtung der 3' UTR (*engl.* Untranslated Regions) der thrombozytären mRNA finden. Dabei handelt es sich um untranslatierte Regionen mit

Einleitung

zentraler Bedeutung für die posttranskriptionelle Genregulation, die neben den dort lokalisierten Bindungsstellen für miRNAs zusätzliche Bindungsstellen für zahlreiche Proteine aufweist, welche die Stabilität, translationale Kontrolle und Transport der mRNA maßgeblich beeinflussen. Interessanterweise ist die 3' UTR thrombozytärer mRNA (1.047 nt) signifikant länger als die 3' UTR nukleärer Zellen (492 nt), während sich die Länge der 5' UTRs nicht wesentlich unterscheidet [241]. Weitere Untersuchungen konnten darüber hinaus zeigen, dass mit dem Strukturmotiv Brd box (engl. Bearded Box) ein weiteres regulatives Element in thrombozytärer mRNA signifikant häufiger vorkommt, deren Regulation dazu komplementären Sequenzen am 5'-Ende ausgewählter miRNAs unterstehen könnte [241, 242]

Die Vermutung liegt daher sehr nahe, dass thrombozytäre mRNAs durch längere 3' UTRs über signifikant mehr regulative Struktur motive verfügen als den mit ihnen vergleichbaren nukleären Vertretern, inklusive mehr Bindungsstellen für spezifische miRNAs.

Thrombozyten könnten dem zu Folge mit einer erhöhten Kapazität für posttranskriptionelle Regulationsmechanismen ihre im Laufe der Thrombopoese natürlicherweise abhanden gekommene Fähigkeit der transkriptionellen Kontrolle kompensieren [243].

Nachweis und Biogenese thrombozytärer miRNA

Die erstmaligen Hinweise auf die Existenz thrombozytärer miRNAs ergaben sich bei Untersuchungen an peripheren Blutzellen in humanen Patienten mit Polycythemia vera und Studien zum differentiellen Expressionsprofil hämatopoetischer Zelllinien [244, 245].

Die Hinweise verdichteten sich kurze Zeit später im Rahmen weiterführender Bestrebungen das differentielle Expressionsprofil in für Transfusionsanlässe gelagerten Thrombozytenkonzentraten zu charakterisieren [246]. Zur großen Einschränkung in der Aussagekraft all dieser Studien konnte ein substantieller Beitrag durch kontaminierende Leukozyten an der Interpretation der gemessenen Expressionsprofile jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Der überproportional größere RNA Gehalt von kontaminierenden Leukozyten (Faktor: 12.500) im Vergleich zu dem von Thrombozyten setzt besondere Maßstäbe an die Reinheit und damit die verwendeten Plättchen-Isolationsprotokolle zur Generierung der Proben [243].

Unter Anwendung einer negativen magnetischen Depletion von kontaminierenden Leukozyten war es schließlich möglich, den Beitrag am thrombozytären Expressionsprofil durch Fremdkontamination auf 0,4% einzugrenzen und so die Existenz eines umfangreichen und diversen Repertoires an miRNAs in Thrombozyten nachzuweisen [10].

Den Autoren war es damals möglich, durch eine Kombination aus Locked-Nucleic-Acid (LNA)-basiertes Microarray Profiling und Northern Blotting die Existenz von mehr als 170 unterschiedlichen miRNAs mit einem Umfang von ca. 2,5 log Einheiten im Expressionslevel in humanen Thrombozyten nachzuweisen, und so die Anzahl der bisher nachgewiesenen miRNAs in Thrombozyten auf insgesamt 219 miRNAs zu bestimmen [10].

Wenig später gelang es, unter Anwendung von modernen High-Throughput Sequencing Techniken mehr als 492 unterschiedliche miRNAs in humanen Thrombozyten zu detektieren [247]. Damit könnten Thrombozyten auf der Grundlage der Variabilität und Umfang ihres miRNAs Repertoires und unter Berücksichtigung ihrer geringen Größe eine der ergiebigsten bisher bekannten Quellen für humane miRNAs darstellen [243]. Interessanterweise verfügen

Einleitung

Thrombozyten nicht nur über ein umfangreiches Repertoire an miRNAs, sondern auch über die dafür notwendigen zytoplasmatischen Bestandteile die zur Konversion von pre-miRNA in reife miRNA erforderlich sind sowie die entsprechenden enzymatischen Bestandteile die zur Ausübung ihrer posttranskriptionellen Regulationsfunktion benötigt werden.

So konnten sowohl die funktionellen Bestandteile des pre-miRNA Prozessierungs-Komplex Dicer und TRBP2 als auch das Ago2 Protein als zentraler Bestandteil des miRNA Effektor-Komplexes nachgewiesen und deren Funktionalität bestätigt werden [10]. Im Kontrast dazu und im Einklang mit dem fehlenden Zellkern in Thrombozyten, war der Nachweis des nukleären Mikroprozessor-Komplexes bestehend aus Drosha und DGCR8 hingegen nicht möglich. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Transkription von pri-miRNAs und deren Konversion in pre-miRNAs bereits auf Ebene der megakaryozytären Vorläuferstadien noch vor der Plättchenformierung erfolgt [243].

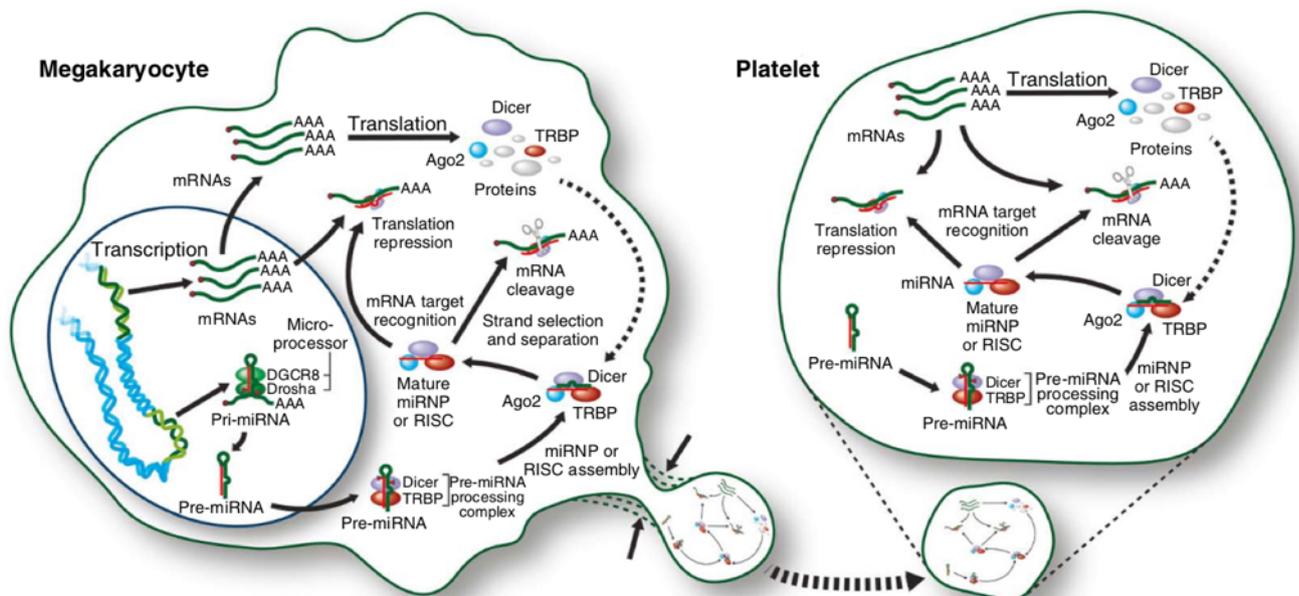


Abbildung 9: Existenz eines funktionellen miRNA Repertoires in Thrombozyten

Quelle: *Nat Struct Mol Biol.* (2009), Landry, Plante [10]

Die weiteren Überlegungen zum Ort der Prozessierung von pre-miRNA zur reifen miRNA Form lassen zwei mögliche Hypothesen zu:

Erstens: Die abschließende Reifung von pre-miRNA in miRNA erfolgt durch die aktive Prozessierung der pre-miRNA auf Ebene der Thrombozyten. Diese Hypothese wird insbesondere durch die gleichzeitige Anwesenheit von pre-miRNA und miRNA in Thrombozyten als auch den Nachweis eines funktionell kompetenten Dicer-TRBP2-Prozessierungskomplexes gestützt. Auch die Beobachtung, dass sich nach Stimulation durch Thrombin das Expressionslevel von sechs miRNAs (miR-15a, miR-339-3p, miR-365, miR-495, miR-98 und miR-361-3p) bei insgesamt 281 detektierten miRNAs auf Ebene der Thrombozyten signifikant ändert, stützt zumindest die funktionelle Möglichkeit dieses Mechanismus und spricht für eine partielle Relevanz dieser Hypothese [20].

Einleitung

Zweitens: Die abschließende Reifung von pre-miRNA in miRNA erfolgt größtenteils bereits auf Ebene der megakaryozytären Vorläuferstadien, die reife miRNA wird anschließend an die Thrombozyten im Rahmen der Thrombopoese weitergegeben. Diese Hypothese wird insbesondere durch den quantitativ höheren Anteil von reifer miRNA im Verhältnis zur pre-miRNA suggeriert.

Während die funktionelle Signifikanz und der relative Beitrag beider Hypothesen bisher noch nicht abschließend geklärt werden konnte, erscheint insbesondere das Zusammenspiel und die partielle Beteiligung beider Hypothesen zum endgültigen miRNA Repertoire in Thrombozyten sehr plausibel.

Unabhängig vom Ort der endgültigen Prozessierung der miRNA in Thrombozyten gibt es hinreichende Belege für die Beteiligung von sowohl Drosha als auch Dicer in der Generierung thrombozytärer miRNA. Dafür spricht insbesondere der überproportional große Anteil von Uracil-Resten (Anteil: 48%) am 5'-Ende der thrombozytären miRNA-Sequenzen als Korrelat für die präferentielle Spaltung der RNase III Enzyme am 5'-Ende im Bereich von Uracil-Nukleinbasen [10].

Funktionelle Bedeutung und biologische Relevanz thrombozytärer miRNA:

Der Nachweis eines umfangreichen und vielseitigen Repertoires an miRNAs in Thrombozyten sowie deren differentiellen Expression in Reaktion auf unterschiedliche externe Umweltfaktoren ruft insbesondere die Frage nach ihrer Funktionalität und biologischen Relevanz in den Vordergrund.

Auch wenn ein nicht unerheblicher Anteil der thrombozytären miRNAs die verbliebenden Zeugnisse der hämatopoetischen Zelldifferenzierung von Megakaryozyten in das reife Thrombozyten Stadium darstellen könnten, besteht die Möglichkeit einer darüberhinausgehenden Funktionalität.

Insbesondere vor dem Hintergrund der bereits beschriebenen regulativen Bedeutung von miRNAs bei der Megakaryopoese [248, 249], gibt es keinen Grund zur Annahme miRNAs könnten keine regulative Funktion in den späteren Phasen der thrombozytären Stadien spielen.

Methodische Voraussetzung für die Ausübung ihrer genregulatorischen Funktion stellt die Inkorporation der miRNA in den mit einem Mitglied der Argonauten Proteinfamilie ausgestatteten miRISC Effektor-Komplex dar [250]. Die stärksten experimentellen Beweise für diese Fähigkeit ergaben Northern Blot Analysen von thrombozytären Ago2 Immunpräzipitaten, welche die Assoziation zwischen Ago2 und der reifen endogenen Form von miR-223 nachweisen konnten.

Neben der Validierung der RISC Aktivität in diesen Ago2 Immunpräzipitaten konnte die funktionelle Rolle von miR-223 in der Steuerung dieses Komplexes durch Interferenz mit einer Antisense RNA und Modifikation der Bindungsregion bestätigt werden. Darüber hinaus war es möglich, eine potentielle Bindungsstelle in der 3' UTR einer mRNA, die für den prurineren G-Protein-Gekoppelten ADP-Rezeptor P2Y₁₂ kodiert, mit Hilfe eines Reporter-gen Aktivitäts-Assays zu identifizieren und die posttranskriptionelle Regulation dieser mRNA durch miR-223 nachzuweisen [10]. Bioinformatische Analysen im Rahmen dieser Studie konnten zudem die

Einleitung

Regulation der 3' UTR von P2Y₁₂ durch mindestens vier weitere thrombozytäre miRNAs (let-7i, miR-21, miR-221 und let-7g) vorhersagen und damit ein Modell nahelegen, in dem multiple miRNAs in koordinativer und synergistischer Zusammenarbeit die Expression einer mRNA regulieren.

Extrazellulärer vesikulärer Transfer thrombozytärer miRNA:

Die Beobachtung, dass Thrombozyten nach ihrer Aktivierung unterschiedliche Formen extrazellulärer Vesikel in ihre unmittelbare Umgebung und darüber hinaus die Blutstrombahn freisetzen [251], erweitert den Rahmen der Möglichkeiten, über die Thrombozyten mit ihrem Umfeld interagieren und gezielt Einfluss auf grundlegende zelluläre Funktionen in ihrer Umwelt nehmen könnten.

In der Tat konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten nach Aktivierung neben Exosomen (Größe: 40-100 nm) größere als Mikropartikel (*engl.* Platelet-Derived-Microparticles) bezeichnete Vesikel (Größe: 100 nm – 1µm) freisetzen, die neben ihrer zentralen Funktion in der Initiierung der Koagulationskaskade [252] und Förderung der Zelladhäsion im Bereich vaskulärer Läsionen [253, 254] eine wichtige interzelluläre Transportfunktion für thrombozytäre mRNA auch miRNA übernehmen [224].

Inzwischen weisen zahlreiche Studien darauf hin, dass Thrombozyten diesen vesikulären Transportmechanismus gezielt zur interzellulären Kommunikation und eine Form des horizontalen Gentransfers nutzen könnten, um nach Internalisierung der thrombozytären miRNA in die Zielzelle durch posttranskriptionelle Reprogrammierung die Funktionalität von Makrophagen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen zu beeinflussen (Abb.: 10) [255-260].

Neben zahlreichen weiteren Zellen setzen sowohl Megakaryozyten als auch Thrombozyten Mikropartikel frei [243]. Schätzungen zu Folge sind dabei mit 45-90% ein Großteil der extrazellulären Vesikel im Blutplasma gesunder Individuen thrombozytären Ursprungs [4, 261, 262].

Die Bildung von Mikropartikeln geht dabei mit einer grundlegenden konstitutionellen Veränderung der thrombozytären Phospholipid-Doppelmembran einher: Im unaktivierten Status zeichnet sich die Plasmamembran von Thrombozyten durch eine asymmetrische Verteilung von Phospholipiden aus, bei der die äußere Membranhälfte von überwiegend ungeladenen Phospholipiden gebildet wird, während die innere Membranhälfte die Aminophospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin enthält [263]. Die asymmetrische Verteilung wird dabei von Phospholipid-Transportern in der Membran aufrechterhalten [264].

Einleitung

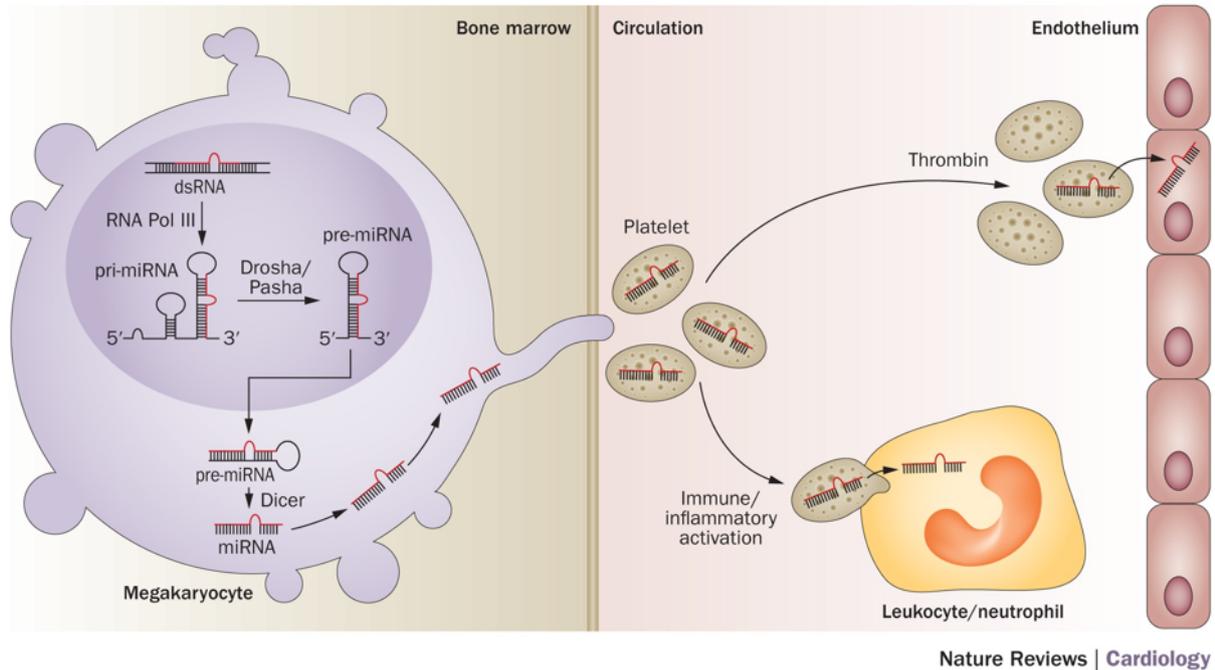


Abbildung 10: Schematische Darstellung des interzellulären Transfers thrombozytärer miRNAs

Quelle: *Nat Rev Cardiol.* (2015), McManus et al. [18]

Die Aktivierung des Thrombozyten und der damit einhergehende Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration verändert schließlich die Aktivität dieser Phospholipid-Transporter, indem die Aminophospholipid Translokase-Aktivität inhibiert und die Phospholipid-Scramblase Aktivität gesteigert wird was schließlich zur Oberflächenpräsentation der Aminophospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin und schlussendlich der Freisetzung der Mikropartikel der führt [265]. Grundvoraussetzung für einen effektiven horizontalen miRNA Transfer stellt dabei ein adäquater interzellulärer Kontakt zwischen Donor- und Rezeptorzelle dar. Die von Thrombozyten freigesetzten Mikropartikel sind prädestiniert für diese Aufgabe, da sie im Laufe ihrer Entstehung durch Abschnürungen von der Plasmamembran aktivierten Thrombozyten dieselben Oberflächenmoleküle aufweisen wie ihre Ursprungszellen und somit neben grundlegenden Glykoprotein-Rezeptoren wie dem Von-Willebrand-Faktor-Rezeptor GPIb (CD42b) und dem Fibrinogen-Rezeptor GPIIb-IIIa (Integrin α IIb β III) weitere zelluläre Adäsionsmoleküle wie P-Selektin (CD62P), LAMP-1/CD10a und CD63 aufweisen [266, 267].

1.5 Fragestellung

Nach einem akuten Myokardinfarkt stellt die frühe interventionelle und pharmakologische Reperfusion des ischämischen Myokards die effektivste Strategie zur Reduktion der Infarktgröße und Verbesserung des Langzeitüberlebens dar [31, 32]. Trotz signifikanter Fortschritte in der Therapie des akuten Myokardinfarktes sieht sich nach wie vor ein großer Anteil der überlebenden Patienten trotz adäquater und leitliniengerechter Primärversorgung langfristig negativen strukturellen Umbauprozessen im Herzen ausgesetzt, die zur Ausbildung einer progredienten Herzinsuffizienz führen und mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität für die Gesamtbevölkerung einhergehen [268].

Die strukturellen und funktionellen Heilungsprozesse im Herzen nach akutem Myokardinfarkt zeichnen sich durch eine heterozelluläre Natur und fein aufeinander abgestimmte zelluläre Interaktionsprozesse aus, deren vielschichtigen regulative Ebenen bisher nur sehr unvollständig verstanden sind [52].

Thrombozyten könnten bei diesen Prozessen, als eine der ersten in das geschädigte Myokard infiltrierenden Zellpopulationen, eine zentrale Rolle in der Weichenstellung der im Anschluss ablaufenden myokardialen Inflammation und langfristigen ventrikulären Remodelingprozesse zu teil kommen.

Die Vorarbeiten unterschiedlicher Arbeitsgruppen aus den letzten Jahre haben gezeigt, dass Thrombozyten eine möglicherweise biphasische Rolle bei der Initiierung und Modulation der Entzündungsvorgänge im Herzen nach Ischämie und Reperfusion spielen und darüber hinaus über eine funktionelle miRNA Biogenese verfügen, mit dem sie potentiell Einfluss auf die zellulären Prozesse ihrer Umgebung nehmen können [10, 130, 256].

Zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Bedeutung thrombozytärer miRNAs und die biologische Relevanz einer funktionellen miRNA Biogenese in Thrombozyten für die unterschiedlichen Phasen der myokardialen Inflammation nach Ischämie und Reperfusion zu charakterisieren sowie deren Stellenwert für den langfristigen Heilungsverlauf im Herzen im Rahmen des myokardialen Remodelings zu erforschen.

Um diese Fragestellung systematisch zu ergründen, war es darüber hinaus das Ziel, in eigenen Vorarbeiten unter Anwendung von Next-Generation-Sequencing Methoden in bisher nicht beschriebener Tiefe das miRNA Repertoire in murinen Thrombozyten zu erfassen und die Auswirkung der MK/thrombozyten-spezifischen Deletion der Endoribonuklease Dicer auf den Plättchenphänotypen sowie die zelluläre Interaktion mit Immunzellen zu charakterisieren.

Zu guter Letzt sollten erste möglicherweise auch translational relevante und in diesen Krankheitsprozessen regulierte thrombozytäre miRNAs identifiziert werden, um eine Auswahl und Grundlage für tiefere funktionelle Charakterisierungen in anschließenden Studien aufzubauen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Beatmungsgerät	Physiosuite for Mice & Rats, Kent Scientific Corporation, Torrington, USA
CFX96 Real-Time System	Biorad, Hercules, Kalifornien, USA
Digitalkamera (DSC-W40)	Sony Europe BV, Deutschland
Durchflusszytometer (Attune-NxT)	Attune-NxT, Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	BD FACS Calibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Flusskammer (Breite 5 mm, Tiefe 50 µm)	Maastrich Instruments, Maastrich, Niederlande
Herz-Schneidematrix	Zivic Instruments, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
Inveon microPET Scanner	Siemens Healthineers, Knoxville, Tennessee, USA
Isofluran Narkosemittelverdampfer	Völker GmbH, Kaltenkirchen; Deutschland
Kleintierwaage	Kern CM 150-IN Pocket Balance, KERN & Sohn GmbH, Balingen; Deutschland
Konfokalmikroskop	Zeiss LSM 510, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kryotom	Microm HM 505 EV Cryostat, Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
KX-21N Analysesystem	Systemex, Kobe, Japan
Lab-on-a-Chip-System BioAnalyzer2100	Agilent, Santa Clara, USA
Lichtscheibenfluoreszenzmikroskop	Sonderanfertigung, Rudolf Virchow Center for Translation and Integrative Bioimaging, Universität Würzburg, Deutschland
Mikrotom	Jung Multicut 2045, Leica Instruments, Nussloch, Deutschland
MRT: 7T Small Animal MR Tomograph	BioSpec 70/30, Bruker Biospin, Ettlingen, Deutschland
Nanodrop ND-1000	Peglab, Erlangen, Deutschland
Nikon Eclipse Ti2, Inverses Mikroskop	Nikon, Chiyoda, Tokio, Japan
NovaSeq6000	Illumina, San Diego, CA, USA
PET: PETtrace Cyclotron	General Electric Healthcare, Uppsala, Schweden
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Stereomikroskop: ZEISS Stemi 2000-C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Temperaturmonitoring	Physiosuite for Mice & Rats, Kent Scientific Corporation, Torrington, USA
TRACERlab MXFDG synthesizer	GE Healthcare, Liège, Belgien
Ultraschall-Untersuchungsplattform	Vevo Imaging Station, Fujifilm Visual Sonics, Toronto; Kanada
Ultraschallgerät	Vevo2100 Version 1.6.0, Fujifilm Visual Sonics, Toronto; Kanada
Ultraschallsonde	High-Frequency Linear Array Transducer MS400 18-38 MHz, Fujifilm Visual Sonics, Toronto; Kanada

Material und Methoden

Zentrifuge	Modell Rotina 420R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
------------	--

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Boyden-Kammer (48-Well Micro Chemotaxis Chamber)	Neuro Probe, Maryland, USA
Braunüle: Intubation (22G 0,90 x 25 mm)	Vasofix® Braunüle®, FEP, B. Braun, Melsungen, Deutschland
Deckgläschen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Einbettmedium: Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, California, USA
FACS-Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Fettstift	Super PAP Pen Liquid Blocker, Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
Injektionskanülen (30G 0,3 x 12 mm)	B. Braun Sterican, B. Braun, Melsungen; Deutschland
Injektionsspritzen	Firma B. Braun, Melsungen; Deutschland
Insulinspritze (30G 0,3 x 8 mm)	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey; USA
Kryotomklingen	Mikrotomklinge S35, PFM medical AG, Nonnweiler, Deutschland
LD Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Ligaturfaden: Perma Hand (7-0)	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Membran Boyden-Kammer (Porengröße: 3 µm, Polycarbonate membranes, 25x80mm)	Neuro Probe, Maryland, USA
Monocyte Isolation Kit, BM, Mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nahtmaterial: Prolene (6-0)	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Nahtmaterial: Vicryl (6-0)	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Objektträger (Gefrierschnitte)	SuperFrost Plus, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Polyethylenschlauch (0.28mm ID 0.61mm AD)	Fine Bore Polythene Tubing, Portex™, Smiths Medical International Ltd., Kent, UK
Ultraschallgel	Sonogel® Vertriebs GmbH, Bad Camberg; Deutschland
Wattestäbchen	Bel premium, CMC Consumer Medical Care GmbH, Sontheim/Brenz; Deutschland
Zellfilter (Partikelgröße: 30 µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

2.1.3 Chirurgische Instrumente

Arretierende Nadelhalter	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Elektrokauter	Bovie® Aaron Medical, Florida; USA
Gebogene Stumpfe Pinzetten	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Mikro Federscheren	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland

Material und Methoden

2.1.4 Pharmakologische Substanzen, Infusionslösungen

Atipamezolhydrochlorid (5 mg/ml)	Antisedan®, Vetoquinol Ismaning, Deutschland
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen; Deutschland
Buprenorphinhydrochlorid (0,3mg/ml)	Buprenovet®, Bayer, York, Vereinigtes Königreich
Enthaarungscreme	Veet Enthaarungscreme Sensitive, Reckitt Benckiser, Slough; Vereinigtes Königreich
Fentanylcitrat (50 µg/ml)	Fentadon®, Eurovet Animal Health, Bladel, Niederlande
Flumazenil (0,1 mg/ml)	Flumazenil HEXAL®, HEXAL AG, Holzkirchen, Deutschland
Glucose 5% Injektionslösung	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Isofluran CP® , 1ml/ml	CP-pharma®, Burgdorf; Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung: NaCl 0,9%	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Medetomidinhydrochlorid (1 mg/ml)	Sedator®, Eurovet Animal Health, Bladel, Niederlande
Midazolam (1 mg/ml)	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln, Deutschland
Ringerlactat: Ringer-Injektionslösung	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Ticagrelor (Cat. No.: S4079)	Selleck Chemicals, Houston, Texas, USA

2.1.5 Lösungen, Medien, Reagenzien

[¹⁸ O]H ₂ O	Rotem, Leipzig, Deutschland
Apyrase	Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
Benzylalkohol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Benzylbenzoat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
CD45 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Draq5	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 95%	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Evans Blue (Dye content ≥ 75%)	Sigma Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA
Formaldehydlösung (4% Neutral Gepuffert)	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
High Sensitivity DNA Assay	Agilent, Santa Clara, USA
Kollagen	HORM® Suspension (KRH), Takeda Austria GmbH, Linz, Österreich
Lichtgrün-Lösung	Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
Mannose Triflat	ABX, Radeberg, Deutschland
May-Grünwald/ Giemsa	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
N ¹ -2-Ethansulfonsäure(HEPES)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphorwolframsäure-Orange-G-Lösung	Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA

Material und Methoden

Ponceau-Fuchsin-Lösung	Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
ProLong Gold Antifade	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
Prostaglandin I ₂	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
QIAseq miRNA Library Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIASymphony RNA Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNA 6000 Pico Assay	Agilent, Santa Clara, USA
RNA Broad-Range Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Roti-Histol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose/ D(+) Sucrose 99,7%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Triphenyltetrazoliumchlorid (2,3,5- TTC ≥98%)	Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Zur Synthese, 50 g/l, Merck, Darmstadt, Deutschland
Typ II Kollagenase	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA
Weigert's-Eisenhämtoxylin-Lösung	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit	BioLegend, San Diego, CA, USA

2.1.6 Puffer, Zellmedien

<u>ACD Puffer</u>	12,5 g Natriumcitra 6,82 g Zitronensäure 10 g Glukose Aqua dest. ad 500 ml und mit NaOH auf pH 4,6 einstellen
Bovines Serum Albumin	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Lysepuffer	BD Pharma Lyse™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Normales Esel-Serum	Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
Normales Ziegen-Serum	Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
PBS (Dulbecos Phosphate Buffered Saline mit MgCl ₂ and CaCl ₂)	Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA adjusted to pH 7.4
Raw264.7 Zellen	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland
TriFast	VWR Peqlab, Radnor, Pennsylvania, USA
<u>Tyrodes Puffer (10x)</u>	80 g Natriumchlorid 10,15 g Natriumhydrogencarbonat

Material und Methoden

	1,95 g Kaliumchlorid Aqua dest. ad 1000 ml
<u>Tyrodes-Gebrauchslösung</u>	20 ml Tyrodes-Puffer (10x) 0,2 g BSA 0,2 g Glukose Aqua dest. ad 200 ml mit HEPES auf pH 7,4 einstellen, 50 ml abnehmen, den Rest mit HCl auf pH 6,5

2.1.7 Antikörper

<u>Primärantikörper:</u>	<u>Klon:</u>	
CD62P-FITC Anti-Mouse	Wufg.E3	Emfret Analytics, Eibelstadt, Deutschland
CD42b-Dylight 649 Anti-Mouse	Xia.G5	Emfret Analytics, Eibelstadt, Deutschland
CD42b-FITC Anti-Mouse	Xia.G7	Emfret Analytics, Eibelstadt, Deutschland
CD45-APC Anti-Mouse	30-F11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD45-Brilliant Violet 421™ Anti-Mouse	30F11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD11b-APC/Fire™750 Anti-Mouse	M1/70	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ly6G-AlexaFluor™700 Anti-Mouse	1A8	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ly6C-APC Anti-Mouse	HK1.4	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD64-PE/Cy7 Anti-Mouse	X54-5/7.1	BioLegend, San Diego, CA, USA
MHC-II(I-A/I/E)-AF™488 Anti-Mouse	M5/114.15.2	BioLegend, San Diego, CA, USA
CCR2-PE Anti-Mouse	475301	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
CD31/PECAM-1 Anti-Mouse	Polyklonal	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
α-SMA (Smooth Muscle Actin) Anti-Mouse	EPR5368	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
CD68-A647 Anti-Mouse	FA-11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD16/CD32 Anti-Mouse	93	BioLegend, San Diego, CA, USA
AF 488 Phalloidin		Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

<u>Sekundärantikörper:</u>	<u>Klon:</u>	
----------------------------	--------------	--

Material und Methoden

IgG Secondary Antibody A555	Polyklonal	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
IgG Secondary Antibody A488	Polyklonal	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

2.1.8 Bioinformatik: Software

BioRender.com (2021)	https://app.biorender.com/biorender-templates .
Circlize Package (Version 0.4.15)	Autor: Zuguang Gu [269]
edgeR (Version 3.11)	Bioconductor
Flowjo	Flowjo LLC Ashland, OR, USA
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, LLC
ImageJ	Open Source, National Institutes of Health
Imaris (Version 9.7)	Bitplane, Oxford Instruments, Vereinigtes Königreich
miRWalk 2.0	Autor: Harsh Dweep [270]
Nf-core smrnaseq tool (Version 1.0.0)	https://github.com/nf-core/smrnaseq
NIS-Elements AR Analysis (Version 5.21.00)	Nikon Corporation, Chiyoda, Tokio, Japan
PMOD	PMOD Technologies Ltd, Zürich, Schweiz
Vevo 2100 (VevoLAB und VevoStrain)	FUJIFILM VisualSonics Version 3.1.

2.2 Methoden

2.2.1 Transgenes Mausmodell

Dicer^{lox/lox} Mäuse wurden wie zuvor von Bradley S. Cobb beschrieben generiert [271]. Zur MK/thrombozyten-spezifischen Deletion von Dicer wurden Dicer^{lox/lox} Mäuse mit Pf4-Cre transgenen Mäusen (Jackson Laboratory) gekreuzt, um Dicer^{lox/lox} Pf4-Cre⁺ (Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ}) und Dicer^{lox/lox} Pf4-Cre⁻ (Dicer^{lox/lox}) Mäuse zu erhalten. Für die experimentellen Versuche wurden männliche Mäuse im Alter von 10-12 Wochen verwendet. Alle Tierversuche wurden entsprechend der ARRIVE Guidelines und dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und von dem Regierungspräsidium Tübingen autorisiert (Nummer M 13/18 G nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes).

2.2.2 Herzchirurgische Operation: Mausmodell- Myokardiale I/R

Das Mausmodell der myokardialen Ischämie/ Reperfusion (I/R) ermöglicht die Erforschung der auf den akuten Myokardinfarkt folgenden pathophysiologischen Vorgänge im Herzen an einem lebenden und transgen veränderten Organismus. Dabei können die chronologisch aufeinander folgenden Phasen der akuten und chronischen postischämischen Inflammation einschließlich dem myokardialen Remodeling in einem longitudinalen Studiendesign untersucht werden.

Die Induktion des akuten Myokardinfarktes erfolgt *in vivo* im Rahmen einer standardisierten offenen chirurgischen Intervention an den Koronargefäßen des schlagenden Herzens. Ziel dieses Eingriffes ist die Induktion einer reproduzierbar großen und reversiblen Ischämiezone in einem myokardialen Perfusionsgebiet distal des von der Intervention betroffenen Koronargefäßes (*engl.* Area at Risk, *AaR*).

Der operative Eingriff lässt sich chronologisch in folgende Abschnitte gliedern.

1. Präoperative Vorbereitung:

Nach Beurteilung des Allgemeinzustandes des Versuchstieres und Erhebung des Körpergewichts für die Berechnung der gewichtsadaptierten Narkose erfolgt die Einleitung der Inhalationsnarkose durch kurzes Anfluten mit 5% Isofluran und darauffolgender kontinuierlicher Zuführung von 1,5% - 2,5% Isofluran mit 0,8 – 1,0 l/min Sauerstofffluss. Das Versuchstier wird im ausreichend narkotisierten Zustand nach Überprüfung der Stellreflexe mit Leukofix® Fixierpflaster auf einer beheizbaren Untersuchungsplattform platziert, von der zum einen die Ableitung eines 4-Kanal-EKGs als auch die kontinuierliche Erfassung der Atemexkursionen und Kontrolle der Körpertemperatur (Zieltemperatur: $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$) über eine rektal eingebrachte Temperatursonde möglich ist. Anschließend werden die Augen des Versuchstieres zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen® Augensalbe bedeckt und das spätere Operationsgebiet auf der linkslateralen Thoraxseite mit Enthaarungscreme enthaart. Nach gründlicher Entfernung der Enthaarungscreme erfolgt nun die Feststellung funktioneller und metabolischer Baseline-Parameter des Herzens unter Anwendung nicht-invasiver kardialer Bildgebungsverfahren (Echo, Kardiales PET-MRT) sowie eine mögliche retroorbitale Blutentnahme.

2. Anästhesie & Endotracheale Intubation:

Die Allgemeinanästhesie wird im weiteren Verlauf auf ein balanciertes Narkoseverfahren mit kombinierter reduzierter Inhalationsnarkose (Isofluran 1,5%) und zusätzlicher gewichtsadaptierter Triple-Injektionsnarkose (Fentanyl 0,05 mg/kgKG, Medetomidin 0,5 mg/kgKG, Midazolam 5 mg/kgKG) umgestellt. Die Injektionsnarkose wurde zuvor zur zusätzlichen Hydrierung des Versuchstiers mit 0,9% Natriumchlorid-Lösung verdünnt. Die Applikation der Injektionsnarkose erfolgt dabei intraperitoneal mit einer 30G Injektionskanüle unter Einhaltung der für die intraperitonealen Volumengabe üblichen Grenzwerte von 10 ml/kgKG. Nach Evaluierung einer ausreichenden Narkosetiefe durch Überprüfung der chirurgischen Toleranz (Verlust: Zwischenzehenreflex) wird nun die maschinelle Beatmung durch Herstellung eines endotrachealen Atemweges vorbereitet. Die endotracheale Intubation erfolgt dabei atraumatisch unter Sichtkontrolle in Rückenlage des Tieres auf einer ca. 45° geneigten Intubationsplattform unter Fixierung der oberen Nagezähne. Die Visualisierung der Rima glottidis ist dabei durch Reklination des Kopfes und Retraktion der Zungenmuskulatur

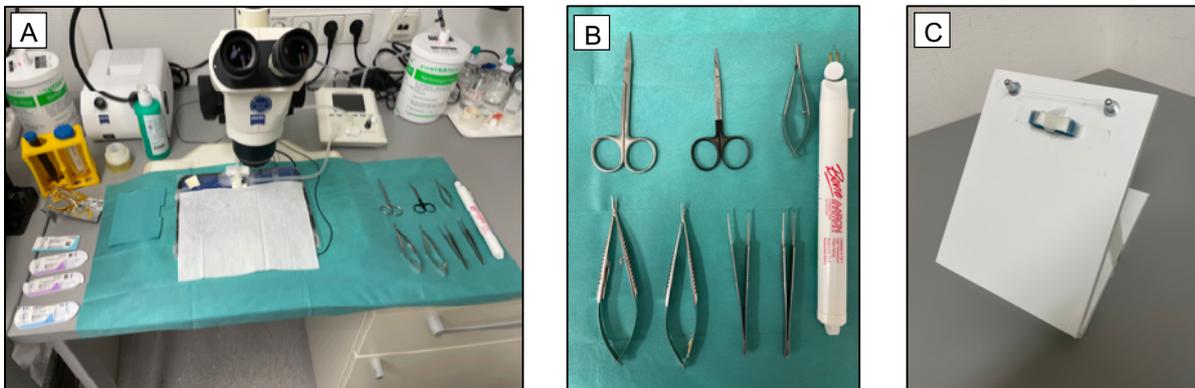


Abbildung 11: Versuchsaufbau Modell Myokardiale I/R
A) OP Arbeitsplatz, B) Chirurgische Instrumente, C) Intubationsplattform

Material und Methoden

bei gleichzeitiger externer Durchleuchtung des Pharynxbereichs mit einer Kaltlichtquelle möglich. Als Tubus wird eine 22G Braunüle (Vasofix® Braunüle®, B. Braun) verwendet, die nach Sicherung des Atemweges mit dem Beatmungsgerät (Physiosuite for Mice & Rats, Kent Scientific Corporation) konnektiert wird. Die Beatmung erfolgt gewichtsadaptiert und volumenkontrolliert mit einem positiven endexpiratorischen Druck und wird perioperativ durch die regelmäßige Beurteilung suffizienter Thoraxexkursionen sichergestellt.

3. Operativer Eingriff:

Im weiteren Verlauf wird das Versuchstier auf einer beheizbaren Unterlage für die Operation gelagert und ein regelmäßiges Temperaturmonitoring (Zieltemperatur: $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$) durch das Einbringen einer rektalen Temperatursonde sichergestellt. Das Versuchstier wird dabei in rechtsthorakale Seitenlagerung verbracht und die linke vordere Extremität im maximal elevierten Zustand fixiert, sodass ein optimaler Zugriff auf das Operationsgebiet möglich ist. Das enthaarte Operationsgebiet wird nun mehrmals mit dem Hautantiseptikum Braunol® desinfiziert und steril mit einem Loch Tuch abgedeckt.

Der mikrochirurgische Eingriff erfolgt im Weiteren unter einem Stereomikroskop. Als operativer Zugangsweg wird eine modifizierte anterolaterale Thorakotomie gewählt. Der ca. 10 mm lange Hautschnitt erfolgt dafür linksthorakal entlang des vierten Interkostalraumes zwischen der Medioklavikularlinie und der mittleren Axillarlinie mit Hilfe einer kleinen Präparierschere. Bei der stumpfen Präparation des subkutanen Fettgewebes wird auf die Schonung der umliegenden Weichteilstrukturen geachtet. Bei Bedarf wird eine lokale Blutstillung durch Elektrokauterisation mit einem Bipolar durchgeführt. Im weiteren Verlauf wird der M. pectoralis profundus mobilisiert und mit einem 6-0 Vicryl (Ethicon®) Faden angeschlungen, der M. serratus ventralis thoracis wird scharf durchtrennt und ermöglicht so den Zugang zum Interkostalraum.

Die Inzision des vierten Interkostalraums erfolgt anschließend scharf unter vorsichtiger Schonung der A. thoracica interna, des Herzens und der Lungengrenzen mit einer mikrochirurgischen Schere. Nach Visualisierung des Ramus interventricularis anterior (RIVA, *engl.* LAD: Left anterior descending artery) als einer von zwei Hauptästen der A. coronaria sinistra wird nun das Perikard vorsichtig mit einer stumpfen mikrochirurgischen Pinzette eröffnet.

Material und Methoden

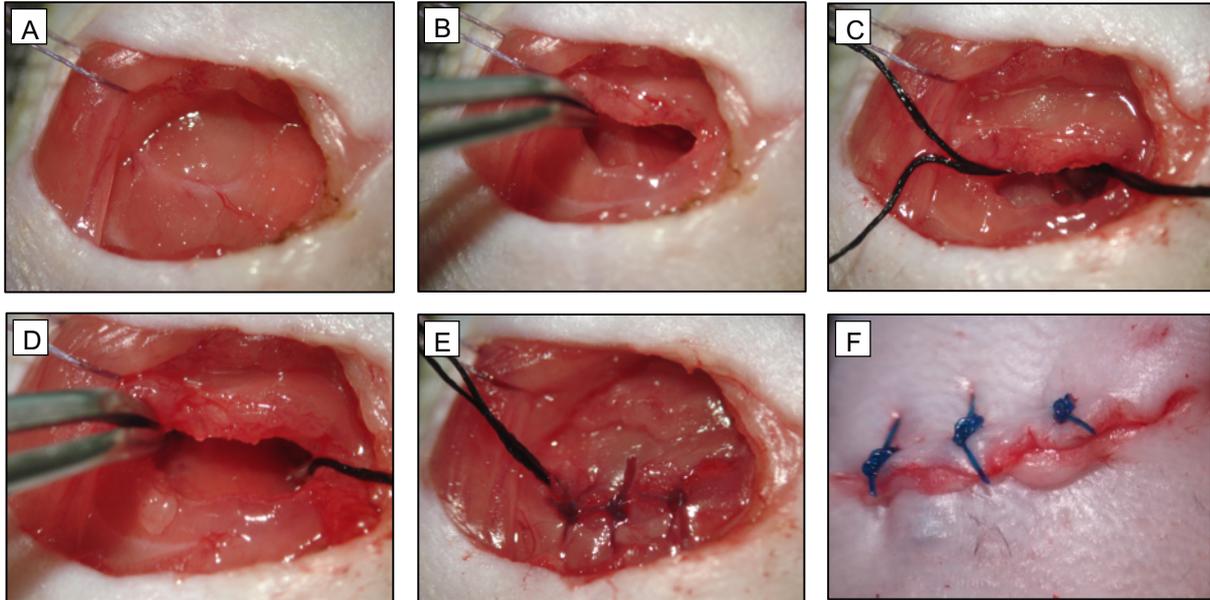


Abbildung 12: Modell Myokardiale I/R- Operativer Eingriff Übersichtsaufnahmen

A) Interkostalraum, B) Thorakotomie, C) LAD Ligatur, D) Reperfusion, E) Interkostalnaht, F) Hautnaht

Die Induktion der myokardialen Ischämie erfolgt nun durch temporäre Okklusion der LAD unter Anwendung einer Fadenligaturtechnik. Dafür wird ca. 1 mm distal des linken Herzohres (Auricula cordis sinistra) die LAD mit einem nicht-resorbierbaren, polyfilen Seidenfaden (Perma Hand 7-0; Ethicon®) unterstochen. Unter Ausbildung einer unfertigen Schleife und Unterlegung eines Polyethylen Schlauchs (Portex®, Smiths Medical, 0.28 mm ID, 0.61 mm OD, Länge: 2 mm) zur gleichmäßigen atraumatischen Druckverteilung wird anschließend eine reversible Okklusion des Koronargefäßes und daraus resultierende transiente Ischämie des distal der Ligaturstelle lokalisierten Myokardbereichs herbeigeführt. Die erfolgreiche Induktion der Ischämie wird dabei visuell durch Entfärbung des Myokards von rosa nach blass validiert und für einen Zeitraum von 30 min. unter regelmäßiger Kontrolle aufrechterhalten, das Operationsgebiet steril abgedeckt.

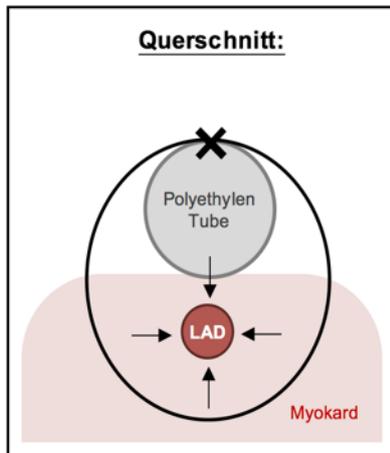


Abbildung 13: Modell Myokardiale I/R- Ligaturtechnik

Nach Ablauf des Ischämiezeitraumes wird die Reperfusionsphase durch Wiedereröffnung der Fadenligatur und Entfernung des Polyethylen Schlauchs eingeleitet. Die erfolgreiche Reperfusion kann erneut visuell durch Inspektion der Myokardverfärbung von blass nach rosa validiert werden. Zur späteren flächenmäßigen Bestimmung der AaR verbleibt der Ligaturfaden im geöffneten Zustand im Myokard. Die beiden Fadenenden werden nach Ausführung aus dem Thoraxraum extrathorakal in einer Muskeltasche unterhalb des M. pectoralis profundus sicher verwahrt. Anschließend erfolgt der luftdichte Verschluss des Thorax durch Umstechung der Rippen des eröffneten Interkostalraumes mit drei 6-0 Vicryl (Ethicon®) Einzelknopfnähten. Zur Vermeidung eines Pneumothorax wird die verbleibende intrathorakale Luft simultan beim Verschluss der letzten Einzelknopfnahrt durch kurzfristigen Aufbau eines zusätzlichen positiven endexpiratorischen Atemwegdrucks verdrängt. Eine zusätzliche Thoraxevakuierung kann bei begründetem Verdacht durch Einbringung einer sterilen 30G Insulinspritze erfolgen. Abschließend erfolgt

Material und Methoden

die Readaptation der Muskulatur mit einer fortlaufenden Kürschnernaht und einem polyfilen resorbierbaren 6-0 Vicryl Ethicon® Faden sowie anschließend die Hautnaht mit drei U-Heften und einem monofilen nicht resorbierbaren 5-0 Prolene Ethicon® Faden.

4. Postoperative Phase:

Nach erneuter Wunddesinfektion wird die Aufwachphase durch Antagonisierung der muskelrelaxierenden und sedativen Wirkung von Medetomidin und Midazolam durch die intraperitoneale Injektion von Atipamezol (2,5 mg/kg KG) und Flumazenil (0,5 mg/kg KG) eingeleitet. Die hochpotente analgetische Wirkung des Fentanyls wird nicht antagonisiert und stattdessen additiv durch eine zusätzliche subkutane Gabe von Buprenorphin (0,1 mg/kg KG) ergänzt. Als weitere unterstützende Maßnahme erhalten die operierten Versuchstiere eine Volumensubstitution aus Glucose 5% und Ringerlactat (10 ml/kgKG) um die Zeit bis zur spontan wiedereinkehenden Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme zu überbrücken. Mit dem Eintreten einer suffizienten Spontanatmung erfolgt die Extubation. Die Versuchstiere werden nach Beurteilung des Allgemeinzustandes und Wiedereintritt der physiologischen Stellreflexe in einen vorgewärmten Tierkäfig verbracht und neben der über drei Tage lang alle acht Stunden fortgeführten Buprenorphingabe regelmäßig postoperativ mittels eines Score-Sheets überwacht.

Ausschlusskriterien:

Zu den Kriterien, die zum vorzeitigen Abbruch des Versuches und der Euthanasie des Versuchstieres führen, zählen eine Verschlechterung des Allgemeinzustands inklusive Gewichtsabnahme von 20% des Gesamtkörpergewichts bezogen auf das Ausgangsgewicht korrigiert um die Gewichtszunahme gleichaltriger unbelasteter Tiere der gleichen Linie. Das weiteren intraoperativ: Kammerflimmern, Lungenkollaps/ Atelektasen und unkontrollierbare Blutungen.

2.2.3 Evans Blue/ TTC Vitalfärbung

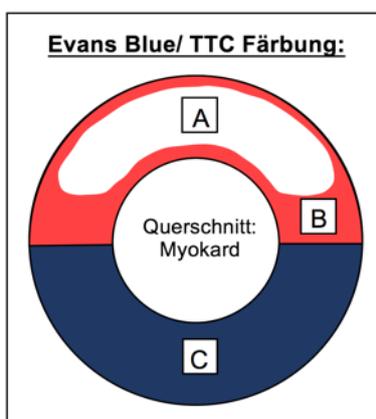


Abbildung 14: Evans Blue/ TTC Färbung

A) Nekrose, B) Vitales Myokard, A+B: AaR, C) Area Not at Risk

Zur quantitativen Auswertung der myokardialen Infarktfläche erfolgt die Opferung der Versuchstiere an Tag 1, Tag 7 und Tag 28. Zu diesem Anlass wird, nach erneuter Einleitung einer balancierten Anästhesie und Wiederherstellung der LAD-Ligatur mit dem an der ursprünglichen Ligaturstelle verbliebenen Faden, das Herz durch die intrakardiale Injektion mit einer 30G Kanüle mit 500 µl Evans Blue Farbstoff 3% perfundiert. Nach gleichmäßiger Distribution des Farbstoffes über den Verlauf von ca. 10 Herzzyklen in dem nicht von der Ligatur betroffenen Myokardbereich (*engl.* Area Not at Risk) wird der Endpunkt durch die intrakardiale Injektion von 200 µl KCl 1mol/l kardiopleger Lösung verdünnt in PBS herbeigeführt. Das Herz wird nach der Entnahme in Tissue-Tek® Einbettmedium überführt und für 20 min. bei -20°C eingefroren, anschließend unter Zuhilfenahme einer Herz-Schneidematrix in 5 bis 7 jeweils 1mm dicke transversale Schnitte unterteilt. Darauf folgt die Inkubation der Schnitte in PBS (pH 7,4) mit 1% TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) für einen Zeitraum von 30 min. in einem

Material und Methoden

Wasserbad bei 37°C, bis das sich der nekrotische Myokardbereich weiß demarkiert während das vitale Myokard rot erscheint. Für die planimetrische Erfassung der nekrotischen Infarktregion, des vitalen Myokardbereichs sowie der AaR werden die Herzschnitte für 24h in 4% Formaldehydlösung unter Lichtabschluss inkubiert und anschließend auf einem Objektträger von beiden Seiten unter einem Stereomikroskop mit einer Digitalkamera fotografiert. Die Berechnung der Infarktfläche erfolgt mit ImageJ als prozentualer Anteil des nekrotischen Myokardbereichs in Relation zur gesamten von der koronaren Ligatur betroffenen AaR.

2.2.4 Ticagrelor Behandlung

Um den Einfluss antithrombozytärer Therapie nach myokardialer Ischämie und koronarer Reperfusion mit Blick auf die regulative Rolle von Thrombozyten bei den Prozessen der myokardialen Inflammation zu untersuchen, wurden die Versuchstiere in einer gesonderten Versuchsreihe mit dem reversiblen P2Y₁₂ Rezeptor-Antagonisten Ticagrelor (Selleck Chemicals, Cat. No.: S4079) behandelt.

Ticagrelor stellt dabei einen gut tolerierbaren potenten Inhibitor der Plättchenaggregation dar, der in der klinischen Praxis täglich Anwendung findet und nach Gabe einen schnellen Wirkungseintritt ohne ernsthafte dosisabhängige unerwünschte Nebenwirkungen in den bisher beobachteten Laborwerten aufzuweisen [272].

Dazu wurden Dicer^{lox/lox} und Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäuse zufällig einer Behandlungsgruppe (Ticagrelor) bzw. einer Kontrollgruppe (Lösungsmittel) zugeteilt und dem experimentellen Eingriff zur Induktion einer myokardialen I/R mit anschließender Echokardiographie nach beschriebenen Protokoll unterzogen.

Die Behandlungsgruppe erhielt 50 mg/kg Ticagrelor aufgelöst entsprechend der Herstellerangaben durch eine intraperitoneale Injektion zwei Stunden vor experimenteller LCA-Ligatur sowie alle 24 Stunden über drei aufeinanderfolgende Tage nach Induktion des Myokardinfarktes, um eine zuverlässige, sichere und effektive Applikation der antithrombozytären Therapie im postoperativen Verlauf zu gewährleisten. Drei Tage nach Induktion des Myokardinfarktes wurde die Ticagrelor Behandlung auf eine orale Gabe über das Trinkwasser umgestellt bis die Versuchstiere nach insgesamt sieben Tage für die Evans Blue/ TTC Färbung geopfert wurden. Die Kontrollgruppe erhielt die gleichen intraperitonealen Injektionen sowie Trinkwasser als Lösungsmittelkontrolle ohne Ticagrelor-Zusatz. Die Effektive P2Y₁₂ Blockade durch Ticagrelor wurde durch aggregometrische Messungen bestätigt.

2.2.5 Echokardiographische Bildgebung

Material und Methoden

Bei der transthorakalen Echokardiographie handelt es sich um eine nichtinvasive Bildgebungsverfahren von zentraler Bedeutung in der kardiologischen Diagnostik, welches mittels Ultraschall über die Charakterisierung grundlegender struktureller und funktioneller kardiovaskulärer Parameter Aussagen über die Funktion des Herz-Kreislauf-Systems ermöglicht.

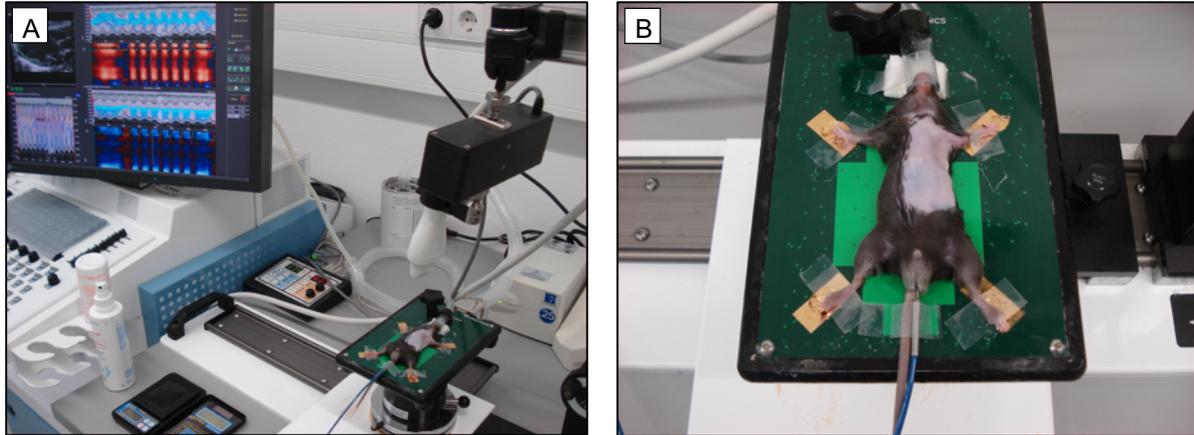


Abbildung 15: Versuchsaufbau Echokardiographie
A) Ultraschall Bildgebungsstation, B) Untersuchungsplattform

2.2.5.1 Konventionelle murine Echokardiographie

Die Erhebung der kardiovaskulären Parameter im Mausmodell der myokardialen I/R erfolgt mit einem für die Kleintierbildgebung geeigneten 30MHz hochfrequenz Linearschallkopf auf einer präklinischen Ultraschall-Untersuchungsplattform Vevo2100. Die Bildgebung wird zum einem an Tag 0 zur Charakterisierung der präoperativen Baseline-Parameter als auch postoperativ im longitudinalen Studiendesign nach Tag 1, Tag 7 und Tag 28 Reperfusion durchgeführt.

Die Untersuchung erfolgt dabei unter Inhalationsnarkose mit 1,5% Isofluran unter kontinuierlicher 0,8 – 1,0 l/min Sauerstoffzufuhr und Ableitung eines 4-Kanal EKGs, regelmäßiger Erfassung der Atemexkursionen und Kontrolle der Körpertemperatur ($37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Nach Feststellung einer suffizienten Narkosetiefe wird das Versuchstier in Rückenlage mit allen vier Extremitäten auf der beheizbaren Untersuchungsplattform positioniert, die Augen werden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen® Augensalbe bedeckt und die linksthorakale Körperhälfte nach gründlicher Enthaarung mit vorgewärmten Ultraschallgel ($37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) bedeckt.

Die Ultraschallaufnahmen werden standardisiert sowohl in der parasternalen langen Achse (PLAX) als auch der parasternalen kurzen Achse (PSAX) im B- und M-Modus auf mittlerer Papillarmuskel-Ebene erfasst. Die Auswertung der Ultraschallsequenzen erfolgt dabei mit der Software Vevo 2100 (VevoLAB und VevoStrain; Vevo2100, FUJIFILM VisualSonics Version 3.1.). Erfasst werden die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF), die fraktionelle Verkürzungsfraction (FS), die kardiale Auswurfleistung (CO), das Schlagvolumen (SV) sowie das linksventrikuläre Volumen als auch der linksventrikuläre Durchmesser in Diastole und Systole.

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion stellt dabei den im Rahmen der Herzkontraktion (Systole) ausgestoßenen prozentualen Anteil des Schlagvolumens am gesamten im linken Ventrikel und am Ende der Diastole befindlichen Volumen (LVEDV) dar.

$$LVEF[\%] = \frac{SV}{LVEDV} \times 100$$

Die fraktionelle Verkürzungsfraction des linken Ventrikels wird im M-Modus der PLAX zwischen dem basalen anteriorem Septum und der basaler posterolateralen Ventrikelwand gemessen und beschreibt die prozentuale Änderung des linksventrikulären basalen Durchmessers über den Verlauf der Systole. Unter der Voraussetzung einer regelmäßigen linksventrikulären Geometrie und einer gleichmäßigen elektrophysiologischen Kammererregung korreliert die FS gut mit der EF.

$$FS[\%] = \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} \times 100$$

2.2.5.2 Speckle-Tracking Echokardiographie: Strain-Analyse

Bei der myokardialen Strain-Analyse handelt es sich um eine Technologie der sonographischen Bildverarbeitung, welche die hoch sensitive Detektion und objektive Quantifizierung bereits diskreter Veränderungen in der myokardialen Deformation, regionalen Wandbewegung und Synchronität als Frühmanifestation der kardialen Dysfunktion ermöglicht.

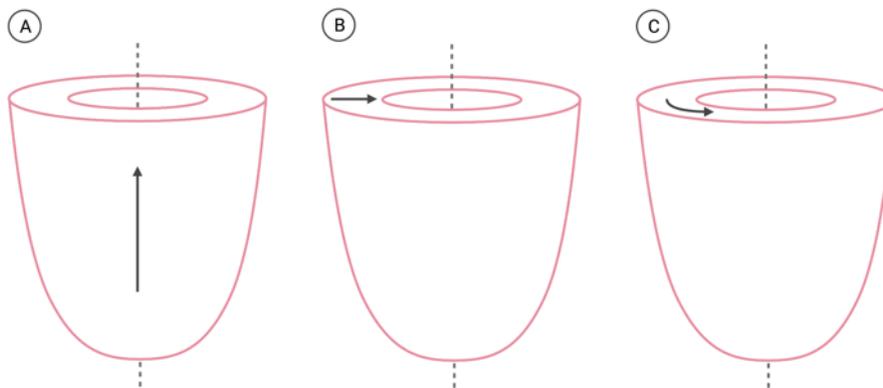


Abbildung 16: Strain-Analyse Richtungsvektoren
A) Longitudinaler Strain, B) Radialer Strain, C) Zirkumferentieller Strain

Die Speckle-Tracking Echokardiographie erlaubt dabei auf Grundlage eines Hoch-Frequenz Ultraschall B-Bildes die detaillierte räumliche und zeitliche Auflösung der globalen und regionalen linksventrikulären Funktion und ist gleichzeitig im Vergleich zum konventionellen Tissue-Doppler Imaging weniger von Untersucher abhängigen Einflussfaktoren wie dem Einschallwinkel des verwendeten Schallkopfes beeinflussbar [273]

Das Prinzip des Speckle-Tracking Algorithmus basiert dabei auf der Detektion von reproduzierbaren Reflektionsmustern im Myokard, die natürlicherweise als physikalisches Phänomen im Ultraschallbild auftreten [274]. Diese sogenannten Speckles entstehen durch

konstruktive und destruktive Interferenz der Ultraschallwellen und erzeugen zu jedem Bildpunkt des Ultraschallbildes eine individuelle akustische Signatur, die über den gesamten Herzzyklus zurückverfolgt werden kann [274]. Über die räumliche und zeitliche Information der Positionsänderung dieser Speckles im Myokard können schließlich zahlreiche myokardiale Deformitätsparameter zur Charakterisierung der kardialen Funktion abgeleitet werden.

Der Strain (ε) ist dabei eine dimensionslose Größe und beschreibt die Deformation eines Objektes relativ zur seiner Ausgangsform [275]. Bei eindimensionaler Betrachtung im Kontext der kardialen Bildgebung entspricht dies der relativen Längenveränderung eines myokardialen Segmentes bezogen auf die Ausgangslänge, die momentane Deformationsänderung innerhalb des Verformungsprozesses zum Zeitpunkt t wird dabei unter den Begriff des Lagrangian Strain zusammengefasst [275]

$$\varepsilon(t) = \frac{L(t) - L(t_0)}{L(t_0)}$$

$L(t)$: Aktuelle Länge
 $L(t_0)$: Ausgangslänge

Die Strain-Rate stellt die Geschwindigkeit der myokardialen Deformation dar und ergibt sich aus der zeitlichen Ableitung des Strains [275, 276]

In der echokardiographischen Strain-Analyse wird in Analogie zu der myokardialen Mechanik der physiologischen Herzkontraktion und entsprechend der anatomischen Richtungsvektoren der bei der Kammerkontraktion wirkenden Kräfte zwischen longitudinalen, radialen und zirkumferentiellen Strain differenziert.

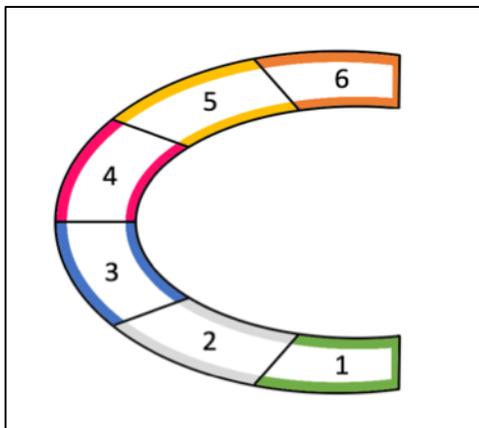


Abbildung 17: Strain-Analyse Myokardiale Segmente (PLAX)

Wall.

Zur Beurteilung der myokardialen Deformation und Darstellung der dynamischen strukturellen Umbauprozesse im Herzen als Folge des myokardialen Remodelings erfolgt die Auswertung der echokardiographischen Aufnahmen im myokardialen I/R Modell nach 28 d Reperfusion.

Zu diesem Anlass wird in der parasternalen langen Achse die endokardiale Begrenzung durch eine semiautomatische Konturanalyse erfasst und in sechs Segmente unterteilt: Basal-Anterior-Septum, Mid-Anterior-Septum, Apical-Anterior-Septum, Basal-Posterior-Wall, Mid-Posterior-Wall, Apical-Posterior-

Qualitative Einschlusskriterien, auf die bei der Aufnahme der Ultraschallsequenzen geachtet wird, sind eine gut differenzierbare endokardiale Begrenzung über den gesamten Herzzyklus und eine Bildrate über 180/s. In jedem myokardialen Segment wird der Strain, Strain-Rate, Displacement (Auslenkung) sowie Velocity (Geschwindigkeit) erfasst und der arithmetische Mittelwert von Time-to-Peak, Peak und Maximum-Opposing-Wall Delay ermittelt.

2.2.6 Kardiale PET-MRT Bildgebung

Material und Methoden

Bei der kardialen Positronen-Emissions-Tomographie (PET)/ Magnetresonanztomographie (MRT) handelt es sich um ein hybrides multimodales Bildgebungsverfahren, welches die Vorteile von zwei separaten nicht-invasiven Bildgebungsentitäten zusammenführt und so die simultane und mehrdimensionale Betrachtung von funktionellen und morphologischen Bildgebungsinformationen ermöglicht [277-279]

Während die PET über die sensitive Detektion eines radioaktiv markierten und durch den Organismus metabolisierten Radiopharmakons die Darstellung molekularer Stoffwechselprozesse erlaubt, ermöglicht die MRT die präzise anatomische Lokalisierung dieser funktionellen Information mit einer exzellenten räumlichen Auflösung und ergänzt diese um weitere Informationen zur Morphologie, Perfusion und Gewebefunktion [279]

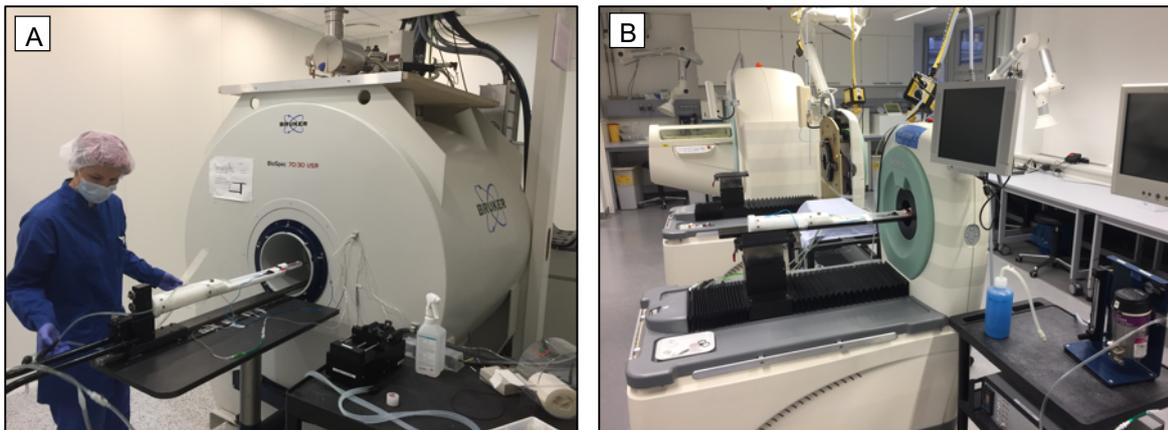


Abbildung 18: Versuchsaufbau Kardiales PET/MRT

A) BioSpec 70/30, 7T Small Animal MR Tomograph **B)** Inveon microPET Scanner

Durch dieses funktionelle Bildgebungsverfahren ist es möglich, *in vivo* und im longitudinalen Studiendesign nach myokardialer I/R über die Darstellung stoffwechselaktiver Myokardbereiche präzise die Größe des Myokardinfarktes und dem damit einhergehenden Fibrosegrad zu quantifizieren, gleichzeitig aber auch durch die temporäre Suppression des myokardialen Glukosemetabolismus das Ausmaß der postischämischen inflammatorischen Zellaktivität im Myokard darzustellen.

Das zu diesem Anlass verwendete Radiopharmakon 2-Deoxy-2- ^{18}F -Fluor-D-Glucose (^{18}F FDG) wurde im Department für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie der Universität Tübingen synthetisiert. Dazu wurde ^{18}F Fluorid an einem PETTrace Cyclotron durch die nukleäre Reaktion von $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ mit ^{18}O H₂O hergestellt. Die Synthese von ^{18}F FDG erfolgte automatisiert an einem TRACERlab MX FDG Synthesizer über Mannose Triflat als Vorläufer nach bereits etablierten Protokoll [280] gemäß den Vorgaben der Europäischen Pharmacopoeia.

Nach Einleitung eines ausgewählten Anästhesieprotokolls (s.u.) werden 11-13 MBq ^{18}F FDG durch Injektion über die laterale Schwanzvene des Versuchstieres appliziert. Anschließend folgt über einen Zeitraum von 60 min. unter Anästhesie die Distributionsphase des Radiopharmakons, gefolgt von einer 10 min. statischen PET Scanphase an einem Inveon microPET Scanner und einer 13 min. Schwächungskorrekturmessung (^{57}Co Source). Die dreidimensionale Rekonstruktion der PET Aufnahmen erfolgt iterativ nach dem Ordered Subset Expectation Maximisation (OSEM) Algorithmus.

Material und Methoden

Anschließend werden die MRT Sequenzen an einem 7T Kleintier MR Tomographen (BioSpec 70/30) aufgenommen. Zur anatomischen Referenz wurde ein 3D T1-Gewichtetes FLASH Protokoll (Echo Zeit (TE) 2.644 ms, Repetitionszeit (TR) 8.785 ms, Anregungswinkel 10°, FOV 75x35x21.12 mm³, Auflösung 0.276x0.257x0.22 mm³, Gesamt Aufnahmedauer 1 min 54 s 701 ms) sowie ein 3D T2-Gewichtetes RARE Protokoll (TE 31.40 ms, TR 800 ms, FOV 75x35x21.12 mm³, Auflösung 0.293x0.273x0.23 mm³, Gesamt Aufnahmedauer 9 min 48 s 800 ms) akquiriert.

Die digitale Datenauswertung zur Analyse der regionalen [¹⁸F]FDG Aufnahme im Myokard sowie die Generierung eines 17-Segment Polartomogramms erfolgt nach Akquirierung der Sequenzen über das PMOD Softwarepaket.

2.2.6.1 Kardiales PET-MRT: Myokardiale Fibrose

Zur bildgebenden Diagnostik der kardialen Stoffwechselaktivität und Ausprägung der myokardialen Fibrosierung im zeitlichen Verlauf der Reperfusionstherapie erfolgt die hybride PET/MRT Bildgebung unter ausschließlicher Isofluran-Inhalationsnarkose an Tag 7 und Tag 28 nach myokardialer I/R.

Zu diesem Anlass wird das Versuchstier mit 1,5% Isofluran unter kontinuierlicher reiner Sauerstoffzufuhr (0,8 – 1,0 l/min) in einer Narkosebox anästhesiert und nach Feststellung einer suffizienten Narkosetiefe in ventraler Bauchlage auf der Untersuchungsplattform positioniert. Über den gesamten Untersuchungszeitraum wird die Körpertemperatur (37 ± 0,5°C) kontrolliert und die Augen zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen® Augensalbe abgedeckt.

2.2.6.2 Kardiales PET-MRT: Myokardiale Inflammation

Die Verwendung von [¹⁸F]FDG als radioaktives Glukose-Analogon zur selektiven Darstellung der inflammatorischen Zellaktivität im Myokard macht die temporäre Suppression des myokardialen Glukosemetabolismus notwendig [279].

Sowohl die in das Myokard im Rahmen der Ischämie und Reperfusion rekrutierten inflammatorischen Zellen als auch die verlebenden vitalen Kardiomyozyten stellen metabolisch hoch aktive Zellpopulationen im Herzen mit einem aktiven Glukosemetabolismus dar [281]. Im Gegensatz zu inflammatorischen Zellen, deren Stoffwechselbedarf grundlegend von der Zufuhr von Glukose abhängt, können Kardiomyozyten im Normalzustand abhängig von ihrem metabolischen Zustand sowohl Glukose als auch freie Fettsäuren zur Deckung ihres Energiebedarfes verwenden [281-283].

Ziel dieser Bildgebungsstrategie ist es daher, den kardialen Metabolismus des Versuchstieres vor der Injektion des Radiopharmakons durch Präkonditionierung in Form einer fünfstündigen Fastenperiode schwerpunktmäßige auf die Metabolisierung von freien Fettsäuren umzustellen, sodass das [¹⁸F]FDG Signal im Herzen über diesen Zeitraum selektiv auf die inflammatorische Zellaktivität zurückgeführt werden kann.

Da die Einleitung einer konventionellen Isofluran-Inhalationsnarkose im Versuchstier zu einer klinisch messbaren Störung der Blutzucker-Hämostase führt und eine Reduktion des Blutglukosespiegels invers die myokardiale Glukoseaufnahme signifikant steigern würde [284,

Material und Methoden

285], wird das Anästhesieprotokoll alternativ auf eine intraperitoneale Ketamin/Xylazin-Injektionsnarkose (Ketamin: 100mg/kgKG, Xylazin: 10 mg/kgKG) umgestellt, für die diese metabolischen Effekte nicht beobachtet wurden.

Nach Einleitung der Injektionsnarkose und Feststellung einer suffizienten Narkosetiefe wird das Versuchstier in ventraler Bauchlage auf der Untersuchungsplattform positioniert und analog die Körpertemperatur ($37 \pm 0,5^\circ\text{C}$) über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant gehalten. Die die Augen werden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen® Augensalbe abgedeckt.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren, das die schnelle, objektive und multiparametrische Charakterisierung von einzelnen Zellen unterschiedlichen Typs in einer Suspension ermöglicht.

Die untersuchten Zellen passieren dabei einzeln nach hydrodynamischer Fokussierung über einen definierten laminaren Fluss eine Messkammer, werden dort von einem Laserstrahl angeregt und emittieren schließlich ein für ihre zellulären Eigenschaften charakteristisches Streu- und Fluoreszenzlicht. Dieses wird anschließend detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt.

Art und Umfang des gestreuten Lichts korreliert dabei mit der Größe und Struktur der detektierten Zelle. Während das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) eine Aussage über die relative Zellgröße erlaubt, gibt das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) weitergehende Informationen über die Granularität und den vesikulären Aufbau der Zelle.

Der Einsatz der in diesem Fall angewandten Fluoreszenz-Durchflusszytometrie ermöglicht darüberhinausgehend über die Anfärbung mit fluoreszierenden Antikörpern die präzise Detektion und Quantifizierung von ausgewählten Antigenen und damit die weitergehende Charakterisierung der zellulären Bestandteile.

2.2.7.1 Analyse der Thrombozytenaktivierung

Zur Analyse des Status der Thrombozytenaktivierung und Quantifizierung der gebildeten Thrombozyten-Leukozyten-Koaggregate im peripheren Blut des Versuchstieres erfolgt eine retroorbitale Blutentnahme von insgesamt 110 μl in ACD Antikoagulans (1:4).

Die durchflusszytometrische Messung wird dabei im Vollblut durchgeführt. Zur Bestimmung der Thrombozytenaktivierung wird eine 1:20 Verdünnung des Blutes hergestellt, indem 10 μl Blut zu 190 μl PBS + Ca^{2+} gegeben werden.

Anschließend werden 25 μl verdünntes Blut nach der Zugabe von 15 μl PBS + Ca^{2+} , 5 μl CD62P-FITC Antikörper und 5 μl CD42b-Dylight 649 Antikörper in einem für die Messung vorgesehenen FACS-Röhrchen unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur für einen Zeitraum von 30 min. inkubiert. Die Inkubation wird nach Ablauf der Inkubationsdauer durch die Zugabe von weiteren 300 μl PBS + Ca^{2+} abgeschlossen und die Proben unmittelbar an dem Durchflusszytometer FACSCalibur gemessen. Es werden Duplikate angefertigt und der

Material und Methoden

arithmetische Mittelwert ermittelt. Die Auswertung erfolgt verblindet mit dem Flowjo Software-Paket.

2.2.7.2 Analyse der Thrombozyten-Leukozyten-Koaggregate

Die durchflusszytometrische Quantifizierung der Thrombozyten-Leukozyten-Koaggregate erfolgt analog in unverdünnten Vollblut Proben. Dazu werden 50 µl Vollblut nach der Zugabe von 10 µl CD45-APC Antikörper und 5 µl CD42b-FITC Antikörper für einen Zeitraum von 30 min. unter Lichtabschluss und bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden die Erythrozyten in der Zellsuspension durch die Zugabe von 500 µl BD Lysepuffer (1:10 in Aqua dest.) lysiert und mit Hilfe eines Vortexmischers homogenisiert. Das Reaktionsgemisch wird unmittelbar durch die Zugabe von 3 ml PBS + Ca² abgeblockt, sobald eine transparente Färbung der Suspension eingetreten ist.

Im Anschluss daran erfolgt die Zentrifugation der Probe bei Raumtemperatur und 3000/ min. für 5 min. Nach Entfernung des Flüssigkeitsüberstandes durch vorsichtiges einmaliges Schwenken der Probe wird die Probe in 300 µl PBS + Ca² resuspendiert und an dem Durchflusszytometer FACSCalibur gemessen. Es werden ebenfalls Duplikate angefertigt und der arithmetische Mittelwert ermittelt. Bestimmt wird der prozentuale Anteil CD42b positiver Zellen zur Ermittlung der in der peripheren Zirkulation gebildeten Thrombozyten-Leukozyten-Koaggregate. Die Auswertung erfolgt verblindet mit dem Flowjo Software-Paket.

2.2.7.3 Immunphäotypisierung myokardialer Leukozyten

Die Immunphäotypisierung der kardialen Leukozytenpopulation nach myokardialer Ischämie und 7d Reperfusion am Durchflusszytometer erfolgt nach bereits etablierten Protokoll [286, 287].

Zu diesem Anlass wird der Endpunkt des Versuchstieres durch Isofluran-Überdosierung herbeigeführt und das Herz entnommen. Zur besseren anatomischen Orientierung wird das Herz anschließend unter Zuhilfenahme der Herz-Schneidematrix in transversale Schnitte unterteilt und das Myokard des gesamten linken Ventrikels zur Weiterverarbeitung zügig prozessiert.

Das myokardiale Gewebe wird darauf folgend mechanisch mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend enzymatisch durch Typ II Kollagenase (1.000 IU/ml) für einen Zeitraum von 30 min. bei 37°C verdaut. Die entstandene Zellsuspension wird danach über einen Zellfilter (Partikelgröße: 30 µm) von festen Gewebestandteilen befreit und anschließend in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) in 1% bovinen Serumalbumin überführt.

Zur Charakterisierung der Zellviabilität und Ausschluss von apoptotischen Zellen wird die Zellsuspension zunächst entsprechend der Herstellerangaben mit dem Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit gefärbt. Anschließend folgt die Immunphäotypisierung der Zellen durch die Oberflächenfärbung mit folgenden primär konjugierten fluoreszierenden Antikörpern: anti-CD45-Brilliant Violet 421™ (Klon: 30F11), anti-CD11b-APC/Fire™750 (Klon: M1/70), anti-Ly6G-AlexaFluor™700 (Klon: 1A8), anti-CD64-PE/Cy7 (Klon: X54-5/7.1), anti-Ly6C-APC (Klon: HK1.4), anti-MHC-II(I-A/I/E)-AlexaFluor™488 (Klon: M5/114.15.2) and anti-CCR2-PE

Material und Methoden

(Klon: 475301) in der Anwesenheit eines anti-CD16/CD32 (Klon: 93) FC-Rezeptor Blockers zur Minimierung von unspezifischen Bindungen.

Die Messung der Proben erfolgt verblindet an dem Durchflusszytometer Attune-NxT gefolgt von der Auswertung mit Flowjo. Die Kompensation für die spektrale Überlappung wurde zuvor auf der Grundlage von Einzelfärbungen als Kontrolle durchgeführt, die Gates wurden auf der Grundlage von „Fluorescence minus one (FMO)“ Kontrollen definiert.

2.2.8 Histologie

Zur Quantifizierung der myokardialen Fibrose wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit Masson-Trichrom-Färbung eingefärbt. Dazu wurden die myokardialen Proben zunächst mit 4% Paraformaldehyd (Otto Fischer GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland) für zwei Stunden fixiert, anschließend in einer Reihe von Ethanol-Lösungen in aufsteigender Konzentration (70% - 95%, Merck KG, Darmstadt, Deutschland) dehydriert um daraufhin in Roti-Histol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) für weitere zwei Stunden vor der Paraffineinbettung inkubiert zu werden. Die Herzproben wurden nach der Einbettung in Paraffin an einem Mikrotom (Jung Multicut 2045, Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) in 4 µm dicke Schnitte geschnitten und anschließend auf Objektträgern (SuperFrost Plus, R.Langensbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) für zur weiteren Lagerung aufgetragen. Zur Vorbereitung für die Färbung wurden die Proben zunächst entwacht und rehydriert durch Inkubation der Schnitte in Roti-Histol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) für 20 min. gefolgt von einer Reihe von Ethanol-Lösungen in absteigender Konzentration (95% - 70%, Merck KG, Darmstadt, Deutschland) und anschließender Inkubation in destilliertem Wasser für 15 min. Für die Masson-Trichrom-Färbung wurden die Schnitte zunächst mit Weigert's Eisenhämatoxylin-Lösung (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) für zwei Minuten gefärbt und anschließend für 15 min. unter laufendem kaltem Leitungswasser gebläut. Danach wurden die Proben kurz in destilliertem Wasser gewaschen und daraufhin für 5 min. mit Panceausäure-Fuchsin-Lösung (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA) gefärbt, erneut gewaschen und anschließend mit Phosphorwolframsäure-Orange-G-Lösung (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA) für weitere 10 min. sowie Lichtgrün-Lösung (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA) für weitere 5 min. gefärbt. Alle Schnitte wurden anschließend erneut zur Dehydrierung in einer Reihe von Ethanol-Lösungen in aufsteigender Konzentration (70% - 95%, Merck KG, Darmstadt, Deutschland) und Roti-Histol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert, daraufhin entsprechend der Herstellerangaben mit Eindeckmedium benetzt (Eukitt, O. Kindler & ORSAtec GmbH, Bobingen, Deutschland) und danach mit einem Deckgläschen bedeckt. Die mikroskopische Analyse erfolgte an einem Lichtmikroskop (Eclipse Ni-U; Nikon Europe BV, Netherlands) und die Auswertung mit NIS-Elements AR Analysis 5.21.00. Die fibrotischen Flächen wurden zu diesem Anlass mit der Hand eingezeichnet und in Relation zur Größe des linken Ventrikels quantifiziert.

2.2.9 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei der Immunfluoreszenzmikroskopie handelt es sich um ein mikroskopisches Verfahren, welches die Lokalisierung und strukturelle Aufklärung von Antigenen auf subzellulärer Ebene im histologischen Gewebeschnitt durch die spezifische Bindung von mit einem Fluorophor konjugierten Antikörpern ermöglicht.

Material und Methoden

Die Bildgebung mit einem Konfokalen Laser-Rastermikroskop (*engl.* Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM) hat dabei im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie den Vorteil, dass das Präparat nicht vollständig von dem Lichtweg durchleuchtet, sondern sukzessiv in unterschiedlichen Ebenen von einem Laser abgetastet wird. Durch die dosierte punktuelle Anregung der Fluorophore in aufeinanderfolgenden Bereichen kann das Streulicht minimiert und dadurch das histologische Gewebe zu einer besonders scharfen Darstellung kommen.

Die mikroskopische Darstellung von myokardialen Gewebeschnitten durch eine Immunfluoreszenzfärbung erfordert eine besondere Vorbereitung. Zunächst wird das Herz nach der Entnahme über Nacht bei 4°C in 0,4% Formaldehyd-Lösung fixiert und anschließend zur Kryoprotektion für eine weitere Nacht in aufsteigender Konzentration in zunächst 15% und schließlich 30 % Saccharose in PBS überführt. Das Herz wird im Anschluss daran in Tissue-Tek® Einbettmedium eingebettet und bei einer Temperatur von -80°C eingefroren. Im weiteren Verlauf werden an einem Kryotom 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf SuperFrost Plus Objektträger überführt.

Für die Immunfluoreszenzfärbung werden die Gefrierschnitte zunächst für 20 min. in PBS mit 4% Formaldehyd fixiert. Nach einem anschließenden 30 min. Waschschrift in PBS erfolgt schließlich die Permeabilisierung des Gewebes mit 0,1% Triton X-100 in Natriumcitrat. Nach einem erneuten kurzen Waschschrift mit PBS und Umrandung des Gewebes mit einem Fettstift können die Gefrierschnitte nun mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert werden.

Die mikroskopische Bildgebung erfolgt am Ende an einem Zeiss LSM 510 Konfokalmikroskop. Sowohl die Infarktregionen als auch die umgebende Grenzzone wird mit dem NIS-Elements AR Analysis Softwarepaket in Bezug auf die Objektanzahl, Objektgröße und den flächenmäßigen Anteil am Gesamtbild ausgewertet.

2.2.9.1 Immunfluoreszenzfärbung: Angiogenese

Zur Darstellung der Angiogenese und Quantifizierung der myokardialen Kapillardichte erfolgt der Nachweis des transmembranären CD31 (PECAM-1) Adäsionsmoleküls im Myokard. Dazu werden die Gefrierschnitte zunächst mit 10% Normalen Esel-Serum in PBS für einen Zeitraum von 60 min. bei befeuchteter Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend erfolgt die Inkubation des Anti-CD31/PECAM-1 (Ziege anti-Maus) Primäantikörpers 1:100 in PBS über Nacht bei befeuchteter Luftatmosphäre im Kühlschrank bei 4°C. Parallel erfolgt als Kontrolle die Inkubation einer Ziege IgG Isotypkontrolle in entsprechender Konzentration.

Nach einem kurzen Waschschrift in 0,05% Tween-PBS 0,05% wird schließlich über einen Zeitraum von 45 min. im Dunkeln bei 37°C befeuchteter Luftatmosphäre der Alexa Fluor 555 Sekundäantikörper (Esel anti-Ziege) 1:500 in PBS inkubiert. Für die histologische Darstellung der Zellkerne werden die Gefrierschnitte für einen Zeitraum von 30 min. mit Draq5 1:1000 in PBS gefärbt und anschließend nach Zugabe von ProLong Gold Antifade Eindeckreagenz mit einem Hoch-Präzisions-Deckgläschen zur langfristigen Lagerung bei 4°C bedeckt.

2.2.9.2 Immunfluoreszenzfärbung: Myofibroblasten

Material und Methoden

Die Differenzierung von kardialen Myofibroblasten hat eine grundlegende Bedeutung bei den strukturellen Umbauprozessen des Herzens im Rahmen des myokardialen Remodelings. Zu ihrer mikroskopischen Darstellung eignet sich der Nachweis des filamentären Zytoskelett-Proteins α -SMA (*engl.* Alpha Smooth Muscle Actin).

Zu diesem Anlass werden die Gefrierschnitte zunächst für einen Zeitraum von 60 min. mit 10% Normalen Ziegen-Serum in PBS bei befeuchteter Raumtemperatur blockiert. Im Anschluss daran wird der Anti- α -SMA (Kaninchen anti-Maus) Primärantikörper 1:500 in PBS über Nacht im Kühlschrank bei 4°C in befeuchteter Luftatmosphäre einwirken gelassen. Als Kontrolle wird parallel eine Kaninchen IgG Isotypkontrolle in entsprechender Konzentration verwendet.

Nach einem kurzen Waschschrift mit 0,05% Tween-PBS erfolgt die Inkubation des Alexa Fluor A488 Sekundärantikörpers (Ziege anti-Kaninchen) 1:500 in PBS über einen Zeitraum von 45 min. unter Lichtabschluss bei 37°C befeuchteter Luftatmosphäre. Für die histologische Darstellung der Zellkerne werden die Gefrierschnitte für 30 min. mit Draq5 1:1000 in PBS gefärbt und anschließend nach Zugabe von ProLong Gold Antifade Eindeckreagenz mit einem Hoch-Präzisions-Deckgläschen zur langfristigen Lagerung bei 4°C bedeckt.

2.2.1 Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie (LSFM)

Bei der Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie (*engl.* Light Sheet Fluorescence Microscopy LSFM) handelt es sich um ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren, welches durch ein besonders hohes zeitliches Auflösungsvermögen die effiziente vollständige volumetrische Analyse und dreidimensionale Rekonstruktion optisch geklärter Proben ermöglicht.

Das Bildgebungsverfahren zeichnet sich dadurch aus, dass die Fluoreszenzanregung und die Detektionsachse in zwei senkrecht zueinanderstehenden separaten Lichtwegen aufgeteilt sind. Dadurch entsteht ein optischer Schnitt, der die Probe in aufeinanderfolgenden Fokusebenen anregt und gleichzeitig durch eine parallele Bilderfassung mit einem kamerabasierten Detektor zeiteffizient das Fluoreszenzsignal aufnehmen kann.

2.2.1.1 Übersicht- Technischer Versuchsaufbau

Die verwendete mikroskopische Apparatur ist eine Sonderanfertigung, deren methodischer Aufbau im Detail folgender Publikation zu entnehmen ist [288]. Die zur Illumination eingesetzten Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge 488, 532, 640 nm (Coherent OBIS) und 730 nm (Omicron LUX) werden über eine speziell angefertigte Teleskop-Vorrichtung (BE03M-A, Thorlabs, Newton, NJ, USA) ausgerichtet und feinjustiert.

Anschließend werden die durch ein Olympus Objektiv (UPlanFL N 10x/0.30 for VIS; PlanN 10x/0,25 for 730 nm) kollimierten zwei Laserstrahl-Lichtwege von einem dichromatischen Spiegel DCLP 660 (AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) zusammengeführt. Über ein Zwei-Achsen Galvanometer Scanner (6210H; Cambridge Technologies, Bedford, MA, USA) und eine Theta-Linse (VISIR; Leica, Mannheim, Germany) entsteht schließlich eine virtuelle optische Lichtscheibe, welche über eine Tubuslinse (Zeiss, Göttingen, Deutschland) und ein Illuminations-Objektiv (EC Epiplan-Neofluar 2.5/0.06 M27; Zeiss) die in einer Messkammer befindliche Probe senkrecht zur Beobachtungsrichtung von zwei Seiten anregt. Das bei der Illumination entstehende Fluoreszenzlicht wird dabei senkrecht zur Achse der Fluoreszenzanregung von einem 5x Objektiv (HC PL Fluotar 5x/0.15; Leica, Mannheim, Deutschland) und einer Tubuslinse (Model Valentine RTC; Leica, Mannheim, Deutschland)

Material und Methoden

eingefangen und anschließend von einer scientific complementary metal oxide semiconductor (sCMOS) Kamera (Neo 5.5; Andor, Belfast, Vereinigtes Königreich) mit 2047x2047 Pixel (6.5 μm), 2x2 Binning und 250 ms Belichtungszeit detektiert. Für die sequentielle Aufnahme unterschiedlicher Farb-Channel wird das Fluoreszenzlicht spektral über entsprechende Emissionsfilter (BrightLine HC 525/50 (Autofluorescence), BrightLine HC 582/64 (Alexa Fluor 555), HQ697/58 (Alexa Fluor 647), BrightLine HC 785/62 (Alexa Fluor 750); AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) gefiltert. Das dazu verwendete motorisierte Filter-Rad (HA110A Filter Wheel with ES10 controller; Prior Scientific GmbH, Deutschland) wird dafür in den kollimierten Lichtweg zwischen Detektions-Objektiv und Tubuslinse positioniert. Die mikroskopische Bildaufnahme erfolgt alle 5 μm . Die für die Bildaufnahme verwendeten Hardware-Komponenten werden von der IQ2.9 Software (Andor, Belfast, Vereinigtes Königreich) gesteuert und die Bildsequenzen anschließend im .tiff Format gespeichert.

2.2.1.2 Probenvorbereitung- Murine Herzen

Die Bildgebung im Rahmen der LSMF erfordert eine besondere Vorbereitung und optische Klärung der Proben. Untersucht werden murine Herzen nach myokardialer Ischämie und 7d Reperfusion.

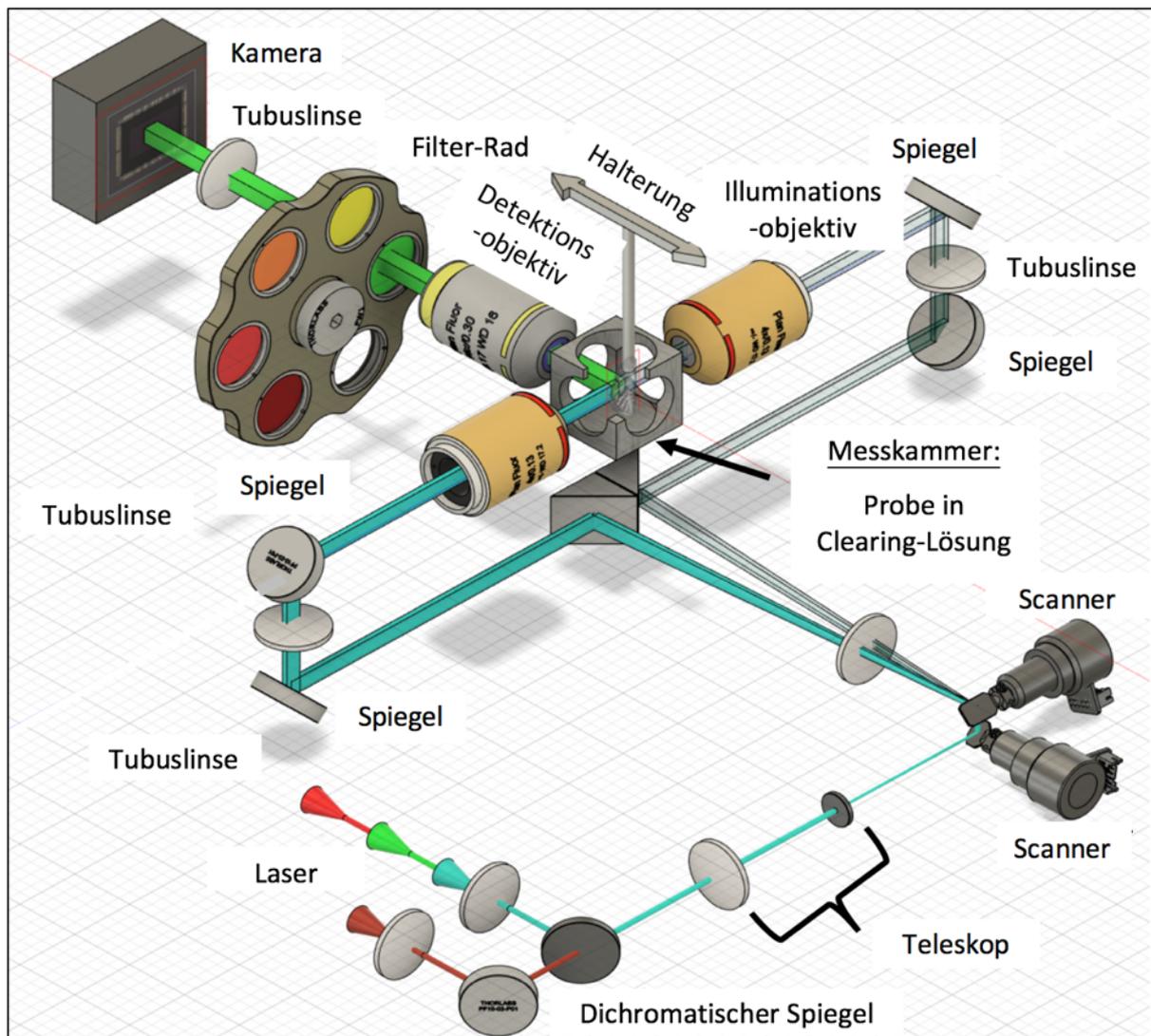


Abbildung 19: Aufbau Lichtscheibenfluoreszenzmikroskop (LSFM)
Darstellung des technischen Versuchsaufbaus und optischen Lichtwegs

Material und Methoden

Zur Darstellung der postischämischen Thrombozytenaggregation im myokardialen Infarktgebiet erfolgt die retroorbitale Injektion eines anti-mGPIX-A750 Plättchen-Antikörpers (2mg/ml) 0,6 µg/g Körpergewicht in NaCl 0,9% zur Perfusion des Herzens für 30 min. Der primär konjugierte Antikörper wurde zu diesem Anlass nach bereits etablierten Protokoll generiert [289]

Nach Herbeiführung des Endpunktes des Versuchstieres und Eröffnung des Brustkorbes wird das Herz mit PBS (Temp.: 4°C) bei einer Flussrate von 6 ml/min. über eine in den basalen Anteil des Herzens eingeführte 26G Nadel perfundiert. Die darauffolgende visuelle Entfärbung der Organe gilt als Indikator für eine suffiziente Spülung von Blutbestandteilen. Anschließend wird das Herz für weitere 8 min. über diesen Zugang mit eiskalter 4% Formaldehyd-Lösung fixiert und nach der Organentnahme von umgebenden Gewebestandteilen befreit. Zur Schonung des bereits injizierten Antikörpers wird bei der Darstellung der Thrombozyten auf ein sonst übliches Bleichen der Proben mit Wasserstoffperoxid verzichtet. Als Nächstes werden die Herzen über einen Zeitraum von zwei Tagen bei 4°C auf einem Rollenmischer mit 2% fetalen Kälberserum und 0,5% TritonX100 in PBS blockiert.



Abbildung 20: Transparente Herzprobe (Murin)
Zustand nach Abschluss der optischen Klärung zur
Bildgebung durch LSFM

Im Anschluss daran erfolgt für die Färbung von kardialen Monozyten/Makrophagen Populationen die Inkubation der Herzproben mit einem primär konjugierten anti-CD68-A647 Antikörper. Dazu wird ein Antikörper-Mastermix hergestellt bestehend aus anti-CD68-A647 (1:100), anti-CD16/32 (1:100) als unkonjugierter FC-Rezeptor-Blocker in PBS mit 0,5% TritonX100, in dem die Herzen über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 4°C unter Lichtabschluss und regelmäßiger Schwenkbewegung belassen werden.

Nach einem weiteren Waschschrift in 0,5% TritonX100 und PBS über zwei Tage und anschließender Dehydratation durch Überführung der Proben in eine Reihe aufsteigender Ethanol-Konzentration (30%, 50%, 70%, 80%, 90%) für jeweils 2h bei Raumtemperatur und 100% Ethanol

über Nacht sind die Herzen bereit für die optische Klärung. Die folgenden Schritte werden unter einem Abzug durchgeführt.

Dazu werden die Proben für 2h in 5 ml n-Hexan bei Raumtemperatur inkubiert, wobei das n-Hexan schrittweise durch BABB Lösung (Benzylalkohol: Benzylbenzoat (1:2)) ersetzt wird, indem unter kontinuierlichem Luftabschluss alle 1,5h 2,5 ml n-Hexan durch BABB ausgetauscht werden. Die Herzen werden anschließend für mindestens weitere 24h in BABB Lösung inkubiert und erscheinen am Ende des Protokolls transparent.

Die akquirierten Bildsequenzen werden in der späteren Bildverarbeitung mit dem BigStitcher Plugin [290] von Fiji [291] zusammengefügt und anschließend in das Imaris-Dateiformat konvertiert, ausgerichtet sowie mit dem Surface Tool von Imaris 9.7 segmentiert. Die Intensitätsschwellen des Thrombozyten-Channels (anti-GPIX-Alexa750) und des

Material und Methoden

Makrophagen/ Monozyten-Channels (anti-CD68-Alexa647) werden im Bereich von 200-400 so angepasst, dass das Autofluoreszenz-Hintergrundsignal ausgeschlossen wurde. Ausschließlich Plättchen-Aggregate und Monozyten/ Makrophagen über 100 Voxel ($\sim 1800 \mu\text{m}^3$) werden für die weitere Analyse berücksichtigt. Die Auswertung der rekonstruierten dreidimensionalen Aufnahmen sowie insbesondere die Analyse der regionalen Verteilung von Thrombozyten und Monozyten/ Makrophagen im Herzen erfolgt nach etablierten Protokoll [292] und Vorlage des linksventrikulären 17-Segment-Model der American Heart Association (AHA). Zur statistischen Analyse wurde neben der segmentalen Verteilung die absolute Anzahl, das gesamte Volumen (μm^3) und das durchschnittliche Volumen (μm^3) der Plättchen-Aggregate und Monozyten/ Makrophagen ausgewertet.

2.2.2 Next Generation Sequencing: Thrombozytäre microRNA

2.2.2.1 Thrombozytenisolation, Leukozytendepletion, Qualitätskontrolle

Die Thrombozyten wurden für die Versuche aus 10-12 Wochen alten *Dicer*^{lox/lox} und *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen isoliert. Die Mäuse wurden dafür zunächst mit Isofluran anästhesiert und Blut aus dem retroorbitalen Plexus in einem Eppendorf Gefäß mit ACD Puffer gewonnen. Anschließend erfolgte ein erster Zentrifugationsschritt bei 264g für 5 min. gefolgt von einer weiteren Zentrifugation bei 52g für 6 min. zur Herstellung von plättchenreichen Plasma (PRP). Nach Zugabe von Apyrase (0.02 U/mL, Sigma-Aldrich) und Prostaglandin I₂ (0.5 μM , Calbiochem) wurde die Probe erneut bei 640g für weitere 5 min. zentrifugiert. Im Anschluss daran erfolgte die Resuspension des entstandene Plättchenpellets in modifizierten Tyrode-HEPES Puffer (pH 7,4) und Leukozytendepletion unter Zugabe von CD45 MicroBeads (Miltenyi Biotec, #130-052-301) und Verwendung von LD Säulen (Miltenyi Biotec, #130-042-901) entsprechend der Herstellerangaben. Nach der Depletion wurden die Thrombozyten zunächst gewaschen und mit RLT Plus Lysis Buffer (Qiagen, #166014596) unter intensivem Vortexen und Homogenisierung lysiert. Im Anschluss daran sind die Proben in Flüssigstickstoff schockgefroren und für die weiteren Analysen bei -80°C gelagert worden. Die hämatologischen Blutparameter wurden unter Zuhilfenahme eines KX-21N Analysesystems (Sysmex) evaluiert. Darüber hinaus wurde die Leukozytenkontamination in einer Nageotte Zählkammer bestimmt und eine Kontamination von unter 1% pro Blutplättchen berechnet.

2.2.2.2 miRNA Sequenzierung

Die Isolation der totalen RNA einschließlich miRNA aus murinen Thrombozyten erfolgte mit dem QIASymphony RNA Kit unter Verwendung des QIASymphony miRNA_CT_400_V8 Protokolls (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Qualität der RNA wurde durch Messung der 260/280 und 230/260 Absorptionsratio an einem Nanodrop ND-1000 (Peglab, Erlangen, Deutschland) bestimmt, während die RNA Konzentration unter Anwendung eines Qubit Fluorometric Quantitation und RNA Broad-Range Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ermittelt wurde. Die RNA-Integritätsnummer RIN wurde unter Verwendung eines Lab-on-a-Chip-Systems BioAnalyzer2100 und dem RNA 6000 Pico Assay (Agilent, Santa Clara, USA) bestimmt. Die Sequencing Library wurde unter Zugabe von 10-20 ng Probenmaterial und Verwendung des QIAseq miRNA Library Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) erstellt. Dazu wurden Adapter charakteristisch und spezifisch für reife miRNAs an die 3'-Hydroxylgruppe und 5'-Phosphatgruppe ligiert. Anschließend erfolgte die sequentielle Synthese von cDNA unter Hinzufügung von UMIs (unique molecular indexes). Nach einer auf magnetischen Beads basierten Reinigung der cDNA wurden die Libraries unter

Material und Methoden

Verwendung von Barcode Primern amplifiziert. Dabei enthielt der Forward Primer einen für alle Proben allgemeingültigen Barcode, während der Reverse Primer mit einem individuellen Barcode versehen wurde. Die Molarität der Libraries wurde unter Verwendung des Bioanalyzer2100 mit einem High Sensitivity DNA assay (both Agilent, Santa Clara, USA) quantifiziert um durchschnittliche Fragmentgröße zu bestimmen, die Konzentration der Libraries wurde unter Anwendung eines Qubit fluorometric quantitation und dsDNA High Sensitivity Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ermittelt. Die Libraries wurden anschließend äquimolar gepooled, entsprechend der Herstellerangaben denaturiert und auf 270 pM verdünnt. Anschließend erfolgte die Paired-End-Sequenzierung an einem NovaSeq6000 (Illumina, San Diego, CA, USA) mit einer Sequenzierungstiefe von >12 Mio. cluster (z.B. read-pairs) pro Probe. Die Analyse der miRNA erfolgte mit Hilfe des nf-core smunaseq tools (version 1.0.0; <https://github.com/nf-core/smrnaseq>). Die Qualitätskontrolle der Raw Reads erfolgte dazu mit FastQC (version 0.11.8) und die Adapter wurden mit Trim Galore! (version 0.6.3) getrimmt. Für das Alignment der mature und hairpin miRNA wurde Bowtie (version 1.3.0) und Ensembl annotations miRBase mature und miRbase von GRCm38 verwendet. Die Post-Alignment Prozessierung der miRBase hairpin wurde mit SAMtools (version 1.10.2) durchgeführt. Die Analyse der miRBase Counts wurde mit edgeR (version 3.11) und TMM normalization durchgeführt. Die miRNA Qualitätskontrolle wurde mit mirtrace (version 1.0.0) validiert. Die Rohdaten der Expressionswerte wurden für >1900 miRNAs in 8 Proben erhoben. Voraussetzung für die Registrierung der Raw Expression war ein minimaler Expressionswert von 1 CPM (*engl.* Count per Million) in mindestens zwei separaten Proben. Der gefilterte Datensatz enthielt > 400 miRNAs. Der gefilterte Datensatz wurde mit Blick auf seine Pairwise-Similarity analysiert. Dazu wurde der Spearman's Rank Korrelationskoeffizient für jedes Paar berechnet und ein hierarchisches Clustering auf Grundlage der erhaltenen Korrelationswerte erstellt. Darüber hinaus wurde eine differentielle miRNA Expressionsanalyse auf Grundlage der gefilterten miRNA Expressiondaten durchgeführt. Dazu wurde ein statistisches Model zur Gruppenzugehörigkeit der Proben auf Grundlage der negativen binominalen Verteilung und des GLM (*engl.* Generalized linear model) Approaches erstellt. Für jede miRNA wurde der Fold Change (\log_2 FC) berechnet. Ein \log_2 FC $\geq 0,5$ wurde als Aufregulation definiert. Ein \log_2 FC $\leq -0,5$ als Herunterregulation. Die statistische Signifikanz wurde auf Grundlage der Benjamin-Hochberg Prozedur berechnet und als FDR (*engl.* False Discovery Rate) angegeben. Ein FDR $<0,05$ wurde als statistische signifikant betrachtet.

2.2.2.3 Funktionelle Prädiktionsanalyse

Die thrombozytären miRNAs, die für die weitere Literaturanalyse und funktionellen Prädiktionsanalyse betrachtet worden sind, wurden auf Grundlage eines Mengendiagramms ausgewählt, welches die differentielle miRNA Regulation in *Dicer*^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} und *Dicer*^{lox/lox} unter Baseline Bedingungen und 7d post myokardialer I/R gegenüberstellt (s. Ergebnisse). Die Prädiktion von potentiellen Zielgenen erfolgte mit miRWalk2.0 und wurde als valide betrachtet, sofern alle vier Datenbanken miRWalk, RNA22, miRanda und Targetscan eine positive Korrelation aufzeigten. Die Gene Ontology Enrichment Analyse erfolgte mit GO-BP um potentiell funktionell relevante Cluster zu identifizieren. Hypergeometrisches Testing (Fisher's exact test) wurde verwendet um die statistische Signifikanz der Genregulation zu bestimmen, gefolgt von einer Benjamin-Hochberg Korrektur für multiples Testen mit einem P-Wert Cut-Off von 0,5 zur Evaluation potentiell durch Zufall entstandener Korrelationen. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden Chord-Diagramme mit R und dem Circlize Package für ausgewählte signifikante funktionelle Cluster angefertigt.

2.2.3 Flusskammer

Mit der Flusskammer lassen sich strömungsbedingte Scherkräfte *in vitro* simulieren und auf diese Weise zelluläre Interaktionsprozesse einschließlich die *ex vivo* Thrombusformation in einem realitätsnahen Modell untersuchen.

Die Flusskammer (Breite 5 mm, Tiefe 50 μm , Hersteller: Maastrich Instruments) wurde zu diesem Anlass vor jeder Messung gereinigt und mit einem neuen Kollagen-beschichtetem Deckglas (24 x 60 mm) zusammengebaut. Die Deckgläser wurden dafür über Nacht bei 4°C mit 200 $\mu\text{g/ml}$ HORM Kollagen (HORM Suspension, Collagen Reagens HORM® Suspension (KRH), Takeda Austria GmbH) beschichtet und vor dem Versuch mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1% BSA blockiert. Zur Entlüftung des Systems wurde die Flusskammer vor der Messung ausreichend mit Tyrodespuffer pH 7.4, 2 mM Ca^{2+} gespült.

Anschließend erfolgte die Probenmessung durch Perfusion der Flusskammer mit heparinisierten und im Verhältnis 3:1 mit Tyrodespuffer pH 7.4 und 2 mM Ca^{2+} verdünnten murinem Vollblut bei einer Scherrate von 1700/s über einen Zeitraum von 3 min. Nach der Perfusion wurde die Flusskammer mit Tyrodespuffer gespült und mikroskopische Bilder aus mindestens fünf verschiedenen Bereichen (20x/40x, Nikon Eclipse Ti2) aufgenommen. Differentialinterferenzkontrast und Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit NIS Elements Imaging Software von Nikon verarbeitet. Die anschließende Analyse erfolgte mit der NIS Elements Analyze Software von Nikon durch Berechnung des arithmetischen Mittelwerts der Thrombus bedeckten Oberfläche (*engl.* Surface Coverage).

2.2.4 Thrombozyten Spreading

Thrombozyten durchlaufen im Rahmen der primären Hämostase und Thrombusformation eine Reihe von dynamischen Veränderungen in ihrer Geometrie und räumlichen dreidimensionalen Ebene. Das sogenannte „Spreading“ stellt dabei einen zentralen Vorgang dar, in dem adhärenzte Thrombozyten durch Deformation in ihrer horizontalen Ebene im Bereich von vaskulären Läsionen ihre Kontaktfläche zur Plasmamembran und damit ihre reaktive Oberfläche vergrößern [293].

Zur Untersuchung des „Spreadings“ von Thrombozyten wird zunächst ein Objektträger über Nacht bei 4°C mit einer Fibrinogen Suspension (100 $\mu\text{g/ml}$) beschichtet und anschließend mit 1% (w/v) BSA blockiert. Anschließend werden die Objektträger mit einer Plättchensuspension (1×10^8 Thrombozyten/ml) in der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Thrombin (10 mU/ml) beschichtet und für 15 min. bzw. 45 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plättchenaktivierung und Adhäsion wird nach Ablauf dieser Zeit durch Fixierung der Thrombozyten mit 4% (w/v) Formaldehyd gestoppt. Zur Immunfluoreszenz-mikroskopischen Darstellung werden die Zellen zunächst für 10 min. mit 0,1% Triton-X100 in PBS (v/v) inkubiert, für 3 min. mit PBS gewaschen und im Anschluss daran mit 1% BSA in PBS (w/v) zur Reduktion von unspezifischen Bindungen blockiert. Danach erfolgt die Färbung der Zellen durch Inkubation von Alexa Fluor 488 Phalloidin Primärantikörper (1:200) in PBS für 15 min. Die Proben werden nach Ablauf der Inkubationszeit erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Nikon Eclipse Ti2 mit einem 100x Öbektiv aufgenommen. Differentialinterferenzkontrast und Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit NIS Elements Imaging Software von Nikon verarbeitet. Die anschließende Analyse erfolgte mit der NIS Elements Analyze Software von Nikon.

Filopodien stellen stachelartige Protrusionen der Plasmamembran dar, die mit dichten parallelen Bündeln von filamentösen Aktin ausgefüllt werden. Lamellipodien stellen dagegen flächenhafte Protrusionen der Plasmamembran dar, die mit einem verästelten Netzwerk aus Aktin ausgefüllt werden [294].

2.2.5 Reverse Transkriptase PCR

Zur Quantifizierung von Dicer mRNA in Dicer^{lox/lox} und Dicer^{Pf4 Δ / Pf4 Δ} Mäusen wurde aus unterschiedlichen Zelltypen zunächst mRNA entsprechend der Herstellerangaben unter Verwendung des TriFast (VWR Peqlab) Isolationsprotokolls extrahiert. Nach Verdauung mit DNase erfolgte die reverse Transkriptase der gesamten RNA unter Verwendung unspezifischer Hexamere und Reverser Transkriptase (Roche Diagnostics). Die Amplifizierung der entsprechenden Gene durch die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) erfolgte in einem Volumen von 25 μ l unter Verwendung von 40ng von cDNA, 400 nM Forward und Reverse Primer und 2x MyTaq HS Red Mix (Biolone) entsprechend des Herstellerprotokolls. Die Polymerase Kettenreaktion erfolgte nach folgendem Protokoll: Zunächst Denaturierung bei 95°C für 3 min., anschließend 30-40 Zyklen (Myokard: 30 Zyklen, Thrombozyten: 35 Zyklen, Leukozyten: 40 Zyklen) bei 95°C für 30 sek., 55°C für 30 sek., 72°C für 60 sek. und 72°C für 300 sek. Zur Amplifizierung wurden folgende Primer in 5'→3' Orientierung verwendet: Dicer1, fwd TCT CAA GCT GTA ACT CCT CG, rev CCT TCA TGA GCA TCA GGG; Gapdh fwd ATC AAC GGG AAG CCC ATC ACC, rev AAG CAG TTG GTG GTG CAG GAT G. Die RT-PCR Amplifizierung wurde in einem CFX96 Real-Time System (Biorad) durchgeführt. Das Housekeeping Gen Gapdh wurde zur Standardisierung des mRNA Probengehalts amplifiziert. Die Banden wurden mit ImageJ quantifiziert und in Relation zu Gapdh normalisiert.

2.2.6 Monozytenisolation

Zur Untersuchung der Dicer-Expression in Monozyten erfolgte die Isolation aus murinem Knochenmark durch Depletion unspezifischer Zellen (z.B. T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Erythrozyten und Granulozyten) unter Verwendung eines kommerziell erwerblichen Depletionskits (Monocyte Isolation Kit, BM, Mouse, Miltenyi Biotec). Dabei werden die unspezifischen Zellen zunächst primär mit einem Cocktail an Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern markiert, an die sekundär ein mit magnetischen MicroBeads konjugierter monoklonaler Anti-Biotin Antikörper bindet. Die magnetisch markierten unspezifischen Zellen werden anschließend durch Retention in der MACS Säule unter Einwirkung eines magnetischen Feldes des MACS Separators depletiert, während nicht-markierte Monozyten die MACS Säule ungehindert passieren können. Die Knochenmark-Zellen wurden zuvor aus murinen Femur- und Tibiaknochen durch Zentrifugation bei 2600xg nach Eröffnung des Knochenmarkkanals extrahiert. Anschließend wurde das gewonnene Knochenmark-Material mit einem Nylon Netz (Porengröße: 30 μ m) gefiltert, entsprechend der Herstellerangaben mit der Miltenyi Kit Pufferlösung gewaschen und daraufhin bei 300xg für 10 min. zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde im Folgenden mit Miltenyi Kit Puffer resuspendiert und die Zellzahl unter Hinzufügen von FcR Blocking Reagenz und Monozyten Biotin-Antikörper Cocktail adjustiert. Nach 5 min. auf Eis und einem erneuten Waschschrift wurde das Zellpellet unter Zugabe von 400 μ l Miltenyi Kit Pufferlösung und Anti-Biotin

Material und Methoden

MicroBeads resuspendiert, gefolgt von einer magnetischen Depletion entsprechend der Herstellerangaben.

2.2.7 Boyden-Kammer Makrophagen-Migrations-Assay

Die Boyden-Kammer stellt eine geeignete Versuchsanordnung dar, welche die Untersuchung des Migrationsverhaltens unterschiedlicher Zellpopulationen in Richtung chemotaktischer Agenzien über eine semipermeable Membran erlaubt.

Um den Einfluss von aktiviertem Plättchenüberstand auf die Migration von Makrophagen zu untersuchen, wurden 100×10^6 Thrombozyten von Dicer^{lox/lox} und Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen für 15 min. mit 0,1 U/ml Thrombin aktiviert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min. bei 640g und darauf der gewonnene Überstand für weitere 10 min. bei 5000g zentrifugiert, um den finalen aktivierten Plättchenüberstand zu gewinnen.

Die Migration von murinen Makrophagen (Raw264.7) in Richtung aktiviertem Plättchenüberstand wurde in einer modifizierten Boyden-Kammer (48-Well Micro Chemotaxis Chamber, Neuro Probe) untersucht. Zu diesem Anlass wurden die oberen Kammern mit 20×10^3 Raw264.7 Zellen verdünnt in 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1% Normocin befüllt. In die unteren Kammern wurde 0,1 U/ml Thrombin (Kontrolle), 100 ng/ml CCL-5 (Positivkontrolle) bzw. aktivierter Plättchenüberstand in Triplikaten hinzugefügt. Nach Inkubation für 4h bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Membran [Porengröße: 3 µm] (Polycarbonate membranes, 25x80mm, Neuro Probe) mit 100% Ethanol fixiert und die in der Membran befindlichen Zellen anschließend mit May-Grünwald/ Giemsa (Carl Roth GmbH & Co KG) gefärbt. Die Membran wurde danach auf einem Objektträger aufgetragen um mikroskopische Aufnahmen mit einem Nikon Eclipse Ni-U (×10 Objektiv) anzufertigen. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde anschließend in jeder Kammer auf einer repräsentativen Fläche von 1470 µm² mit ImageJ bestimmt (ImageJ, National Institutes of Health, USA). Für die repräsentativen Aufnahmen wurde ein Bereich von 735 µm² ausgewählt.

2.2.8 Statistische Analyse

Die Daten wurden als arithmetische Mittelwerte ± SEM dargestellt und n angegeben, um die Anzahl der durchgeführten Experimente aufzuzeigen. Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, LLC) durchgeführt und die Versuchstier-Gruppengröße mit G*Power ($\alpha \leq 0.05$ und Power > 0.80) berechnet. Die Daten wurden unter Verwendung des Student's T-Test und 2-way ANOVA mit dem Sidak's Multiple Comparisons Test, wie in den entsprechenden Abbildungsbeschreibungen angegeben, analysiert. Für die statistische Analyse der miRNA Sequenzierungsdaten wurden abweichende statistische Tests angewandt (s. Methoden). P < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Alle Experimente wurden verblindet durchgeführt und ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Next Generation Deep Sequencing enthüllt ein umfangreiches Repertoire an funktionellen miRNAs in murinen Thrombozyten

Die Erforschung des miRNA Repertoires von Thrombozyten stellt besondere Anforderungen an die Thrombozytenisolation und die Reinheit der generierten Proben. Leukozyten weisen im Vergleich zu Thrombozyten unter Berücksichtigung ihrer signifikant größeren Zellgröße einen um den Faktor 12.500 höheren RNA Gehalt auf [243].

Aus diesem Grund ist eine sorgfältige Leukozytendepletion der gewonnenen Thrombozytenisolate unbedingt erforderlich, um die Kontamination der Proben durch fremde RNA auf ein Minimum zu reduzieren. Wir konnten durch die Etablierung eines angepassten Thrombozyten-Isolationsprotokolls (s. Methoden) die Kontamination durch leukozytäre RNA auf unter 1% begrenzen.

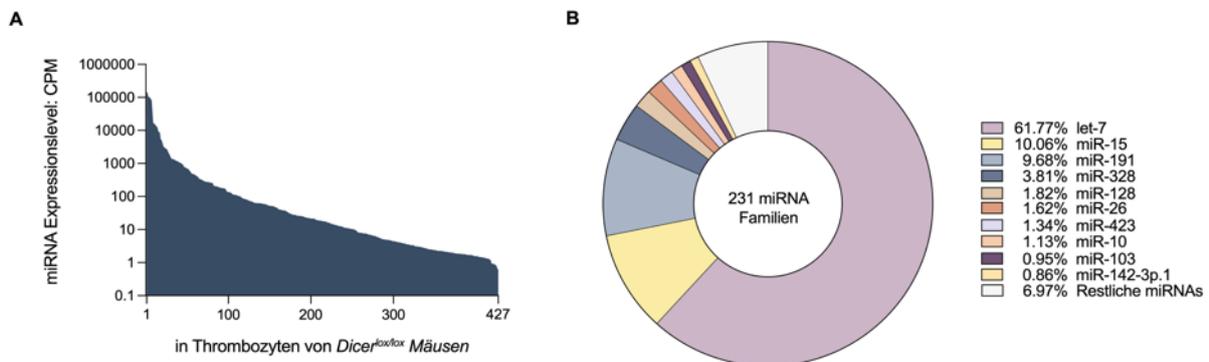


Abbildung 21: Das miRNA Repertoire in murinen Thrombozyten

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al. [13]

Ergebnisse des Next Generation Deep Sequencing aus leukozytendepletierten Thrombozytenisolaten. Dargestellt ist das Expressionslevel der insgesamt 427 detektierten miRNAs (A) sowie die quantitative Verteilung der zehn häufigsten miRNA Familien (B) in murinen Thrombozyten, CPM: Count Per Million

Unter diesen Voraussetzungen war es erstmals möglich unter Verwendung von Next Generation Deep Sequencing Technologien ein umfangreiches und in der Art in murinen Thrombozyten bis zu diesem Zeitpunkt bisher nicht aufgelöstes Repertoire von funktionellen miRNAs darzustellen.

Unsere Erkenntnisse zu Folge verfügen murine Thrombozyten über ein mit humanen Thrombozyten [247] im Umfang vergleichbar vielseitiges Repertoire von insgesamt 427 miRNAs, welche eine große Bandbreite unterschiedlicher Expressionlevel abdecken [13]. Diese miRNAs lassen sich insgesamt 231 miRNA Familien zuordnen, deren zehn häufigsten Vertreter in Abbildung 21 B dargestellt sind.

3.2 Charakterisierung der spezifischen Deletion der Ribonuklease Dicer in der Cre/loxP Maus zur Ablation der thrombozytären miRNA Biogenese

Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses thrombozytärer miRNAs und Charakterisierung der funktionellen Relevanz eines intakten miRNA Stoffwechselwegs in

Ergebnisse

Thrombozyten für die myokardiale Inflammation und reparativen Vorgänge im Herzen nach experimenteller Ischämie und Reperfusion.

Die Aufhebung der miRNA Biogenese durch die unspezifische genetische Ablation von Dicer im gesamten Mausmodell ist aufgrund der kritischen regulativen Funktion von miRNAs während der embryonalen Entwicklung bereits in frühen Stadien letal [295, 296]. Gleichzeitig würde auch eine zu frühe zellspezifische Disruption der miRNA Biogenese in den initialen Stadien der Megakaryopoese zu einer signifikanten Reduktion bis zum vollständigen Verlust von Thrombozyten führen [297-299].

Aus diesem Grund haben wir für unsere Untersuchungen ein transgenes Mausmodell verwendet, in dem erst in den fortgeschrittenen Stadien der Megakaryopoese die Depletion von Dicer und damit die Ablation der thrombozytenspezifischen miRNA Biogenese stattfindet. Dafür wurden Mäuse mit einem durch loxP flankierten Dicer Allel mit Mäusen, die unter Kontrolle des megakaryozyten- und thrombozytenspezifischen Pf4 Promotor (*engl.* Platelet factor 4) Cre-Rekombinase exprimieren, gekreuzt, um die spezifische Deletion der Ribonuklease Dicer zu induzieren.

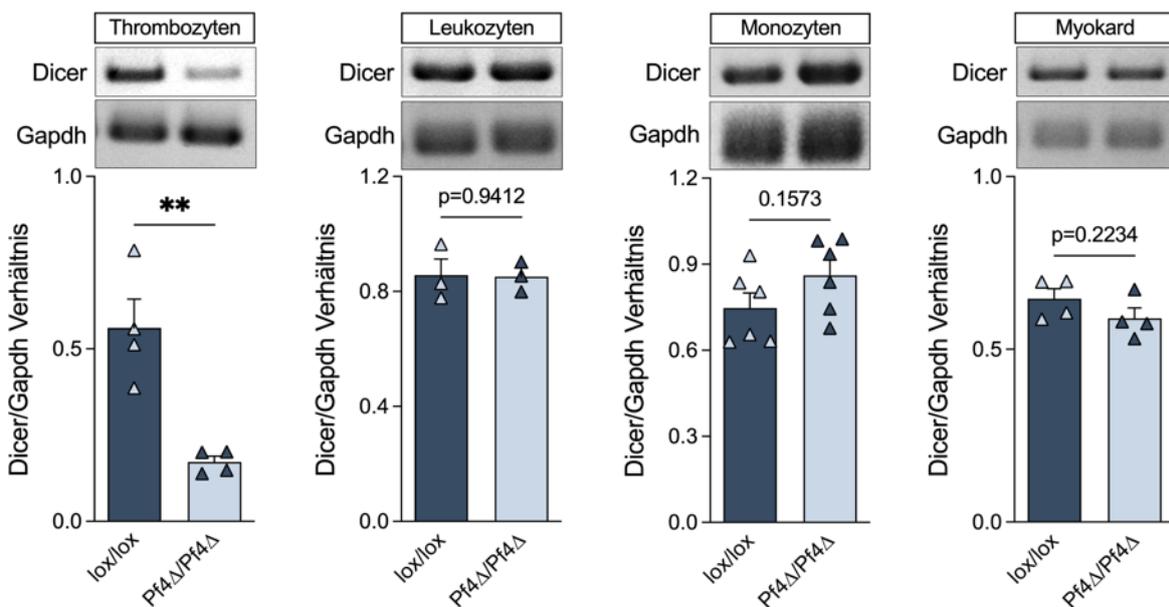


Abbildung 22: Thrombozytenspezifische Deletion von Dicer mRNA in der Dicer^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} Maus

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

Dargestellt ist das Transkriptionslevel unterschiedlicher Zelltypen von Dicer^{lox/lox} (Dunkelblau) und Dicer^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} (Hellblau) Mäusen in der RT-PCR. Arithmetische Mittelwerte \pm SEM (n=4, ungepaarter T-Test, p=0,0038 [Thrombozyten], p=0,9412 [Leukozyten], p=0,1573 [Monozyten], p=0,2234 [Myokard])

Um die Auswirkung der Deletion des Dicer Allels auf die Expression der Dicer Ribonuklease zu quantifizieren und gleichzeitig die Spezifität der Deletion für die megakaryozytäre und thrombozytäre Zelllinie nachzuweisen, wurde das Transkriptionslevel von Dicer mRNA in Thrombozyten sowie in bei der myokardialen Inflammation beteiligten Zelltypen mit Hilfe einer RT-PCR bestimmt.

Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen zeigten eine signifikante und zuverlässige Reduktion von Dicer mRNA in Thrombozyten, während die Expression des Dicer Allels in Leukozyten, insbesondere Monozyten, sowie dem Myokard unbeeinflusst blieb (Abb.: 22) [13].

3.3 Megakaryozyten-/ Thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer reguliert das miRNA Repertoire in murinen Thrombozyten

Im nächsten Schritt war es nun das Ziel, den Einfluss der Pf4-Promotor gesteuerten Deletion von Dicer auf das miRNA Expressionprofil in murinen Thrombozyten zu untersuchen und die Größenordnung der induzierten Veränderungen im Transkriptom auf miRNA Ebene präzise zu beschreiben.

Wir konnten zeigen, dass von den insgesamt 427 thrombozytären miRNAs 81 miRNAs und damit ca. 19% des gesamten miRNA Repertoires in Thrombozyten signifikant ($FDR < 0,05$) durch die Pf4-Promotor gesteuerte Deletion von Dicer reguliert waren [13]. Weitere 21 miRNAs wiesen eine zwar signifikante aber von der Größenordnung der induzierten Veränderung nur moderate ($-0,5 < \log_2 FC < 0,5$) Regulation auf [13]. Dadurch erhöhte sich der Anteil der signifikant regulierte miRNAs in Thrombozyten auf ca. 24%.

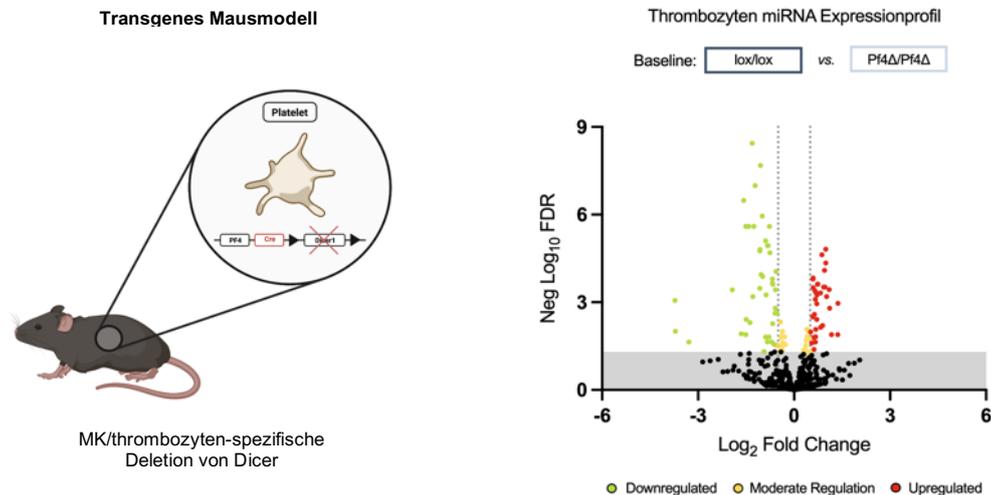


Abbildung 23: Einfluss der MK/thrombozyten-spezifischen Deletion von Dicer auf das miRNA Repertoire

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13] (Modifiziert)

Dargestellt ist eine schematische Abbildung des transgenen Mausmodells (Links) sowie der Einfluss der MK/thrombozyten-spezifischen Deletion von Dicer auf das miRNA Expressionprofil in Thrombozyten im „Vulcano Plot“ (Rechts) zur Visualisierung der Signifikanz und Größenordnung der differentiellen Regulation. Signifikanzniveau $FDR < 0,05$; Herunterregulation (Grün) $\log_2 FC < -0,5$; Aufregulation (Rot) $\log_2 FC > 0,5$; Moderate Regulation (Gelb) $-0,5 < \log_2 FC < 0,5$; FC: Fold Change, FDR: False Discovery Rate

Der Großteil der signifikant regulierten miRNAs wurde durch die MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer herunterreguliert, während ein kleinerer Anteil zwar geringgradig aber dennoch signifikant aufreguliert war.

Ergebnisse

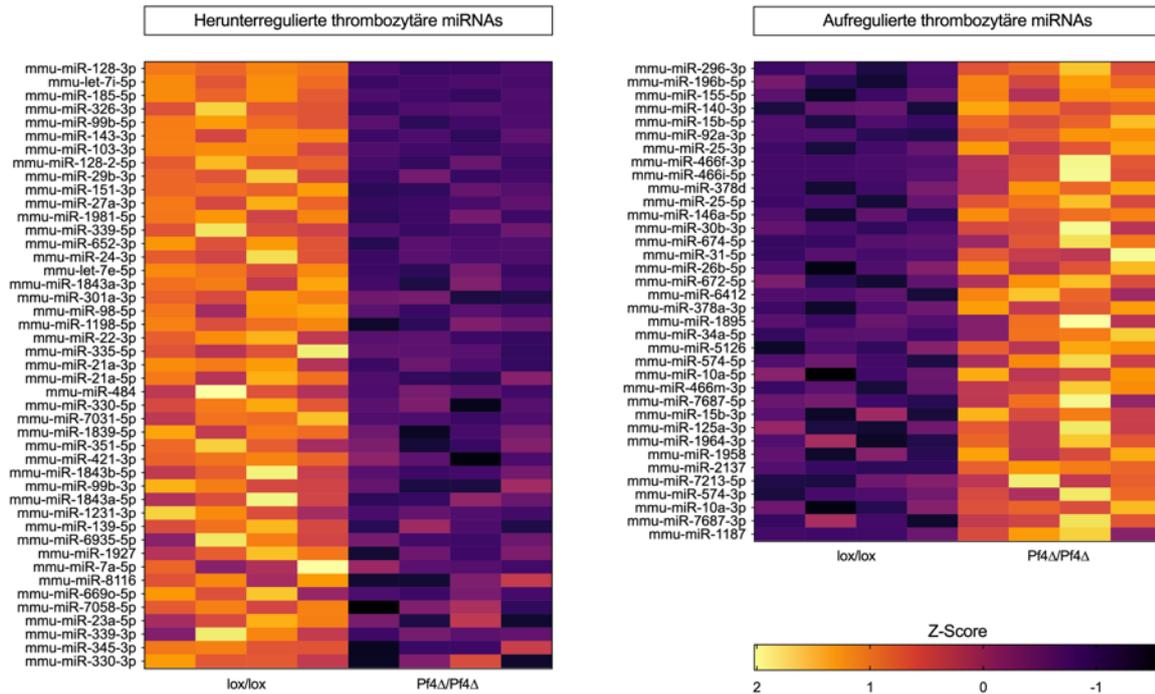


Abbildung 24: Differenziell regulierte thrombozytäre miRNAs durch die MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer
Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

Dargestellt sind die signifikant ($FDR < 0,05$) regulierten miRNAs nach Deletion von Dicer in der transgenen Pf4-Cre Maus. Die Visualisierung erfolgte in einer „Heatmap“, die miRNAs in absteigender Reihenfolge nach ihrem Signifikanzniveau geordnet mit der höchsten Signifikanz in der obersten Zeile. Die einzelnen Spalten repräsentieren das Expressionsprofil des entsprechenden Versuchstieres ($n:4$), Herunterregulation $\log_2FC < -0,5$; Aufregulation $\log_2FC > 0,5$

3.4 Dicer-abhängig differenziell regulierte thrombozytäre miRNAs haben einen signifikanten Einfluss auf essentielle Plättchenfunktionen

Ziel der im Folgenden dargestellten Versuche war es nun, die phänotypische Relevanz der durch die Dicer-Deletion induzierten Veränderungen auf Ebene des miRNA Transkriptoms für die Funktion der Thrombozyten in der primären Hämostase und Thrombusformation zu charakterisieren.

Unseren Erkenntnissen zu Folge hat die MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer zwar keinen signifikanten Einfluss auf die Sekretion und Aggregation der Thrombozyten nach Stimulation mit unterschiedlichen Agonisten (Thrombin, CRP, ADP/U46619) [13].

In weiteren Untersuchungen zur Thrombusformation unter arteriellen Scherraten und räumlichen Geometrie der Thrombozyten nach in vitro Stimulation konnte dagegen gezeigt werden, dass die durch die Dicer-Deletion induzierten Veränderungen des miRNA Expressionsprofils zu einem hyperresponsiven Plättchenphänotypen führen, der sich in einer signifikant erhöhten Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung, Fibrinogen-Bindung und verbesserten „Spreading“ mit Vergrößerung der thrombozytären Oberfläche nach Stimulation mit Thrombin zeigt als auch mit einer signifikant verstärkten Thrombusformation in der Flusskammer einhergeht (Abb: 25) [13].

Ergebnisse

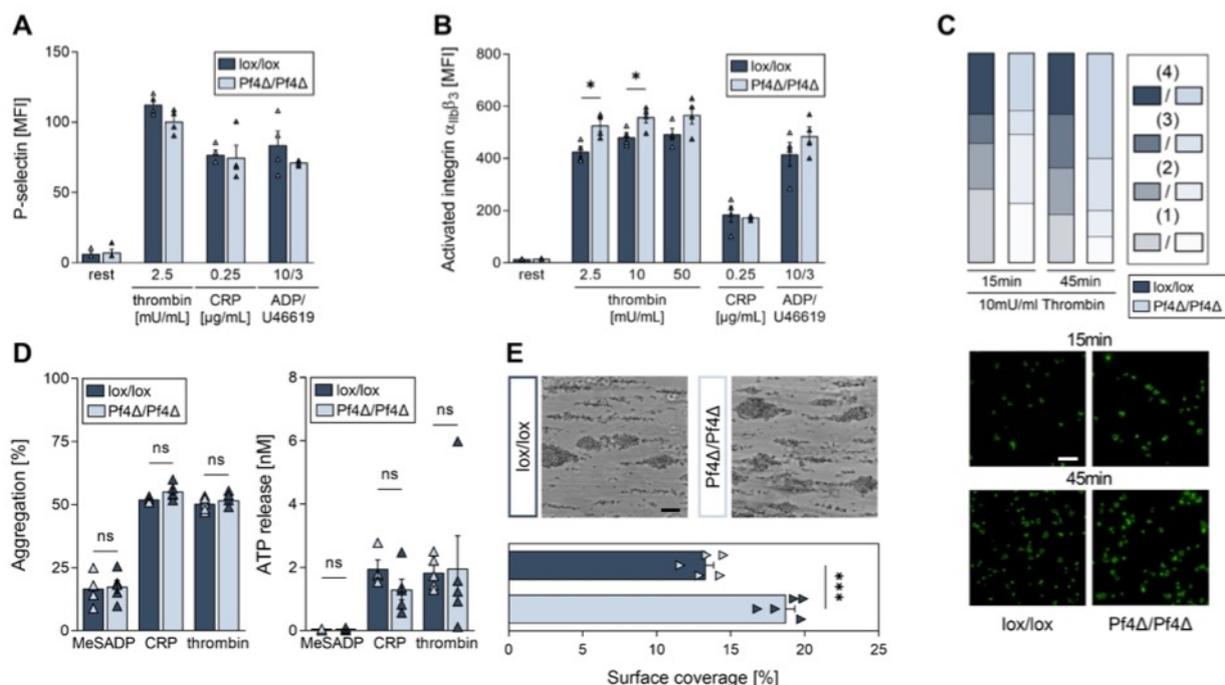


Abbildung 25: MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer induziert einen hyperresponsiven Plättchenphänotypen mit verstärkter Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung, Fibrinogenbindung, vermehrtem Spreading und Adhäsion nach Thrombinstimulation
Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

A. Durchflusszytometrische Untersuchung der P-Selektin/CD62P Oberflächenexpression als Korrelat für die Freisetzung aus α -Granula nach Stimulation mit unterschiedlichen Agonisten (Thrombin, CRP, ADP/ Thromboxan Analogon U46619), **B.** Durchflusszytometrische Untersuchung der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung nach Stimulation mit unterschiedlichen Agonisten (Thrombin, CRP, ADP/ Thromboxan Analogon U46619), **C.** Repräsentative Bilder und Balkendiagramm zur Illustration der Lamellipodien Formation und Spreading von Thrombin-stimulierten Thrombozyten auf Fibrinogen-beschichteten Oberflächen nach 15 min. und 45 min., Von Hell- zu Dunkelblau: (1) Rund, keine Filopodien, keine Lamellipodien, (2) Nur Filopodien, (3) Partielles Spreading, (4) Vollständiges Spreading, Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen für beide Zeitpunkte, Maßstabsbalken entspricht 10 μ m, **D.** Illustration der ATP Freisetzung aus elektronendichten Kerngranula und Aggregation nach Stimulation mit MeSADP (50 nM), CRP (1 μ g/ml) oder Thrombin (20 mU/ml), **E.** Darstellung der flächenhaften Thrombusformation auf Kollagen-beschichteter Oberfläche in der Flusskammer unter Scherraten von 1700/s, Repräsentative Phasen-Kontrast-Aufnahmen, Maßstabsbalken entspricht 20 μ m; Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte + SEM

In Voruntersuchungen durch andere Arbeitsgruppen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die MK/ thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer mit einer signifikant verkürzten Blutungszeit und reduzierten Blutverlust einhergeht [300].

3.5 MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer führt zu einer signifikant vergrößerten Infarktfläche und beeinträchtigten kardialen Funktion

Nach der funktionellen Charakterisierung zum Einfluss der MK/thrombozyten-spezifischen Deletion von Dicer auf den Plättchenphänotyp in vitro war es nun das Ziel, den Einfluss des veränderten thrombozytären miRNA Expressionsprofils auf die myokardiale Inflammation nach experimenteller Ischämie und Reperfusion in vivo zu untersuchen. Zu diesem Anlass wurden *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} und *Dicer*^{lox/lox} Kontrolltiere einem chirurgischen Eingriff zur Induktion einer 30 min. Ischämie und anschließender Reperfusion durch experimentelle transientser Ligatur der linken Koronararterie unterzogen und anschließend unter Anwendung multimodaler kardialer Bildgebungsverfahren im prospektiven Studiendesign über insgesamt 28 Tage untersucht (Abb.: 26).

Ergebnisse

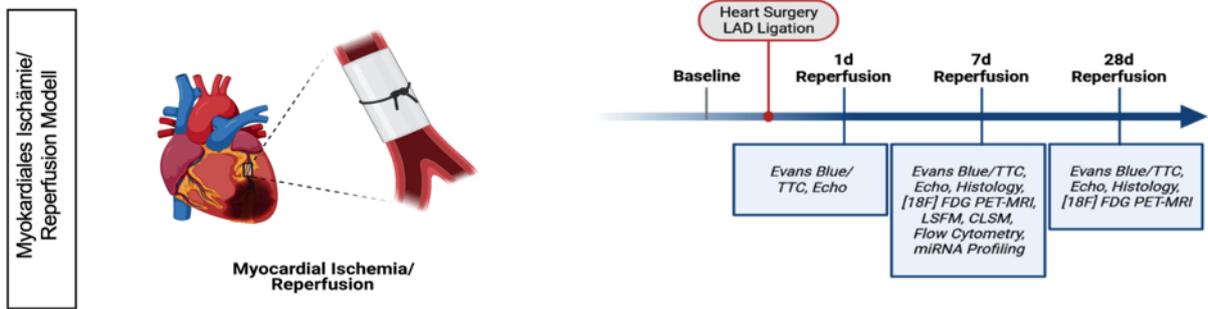


Abbildung 27: Studiendesign zur Induktion der experimentellen myokardialen Ischämie/ Reperfusion im Mausmodell

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

Links: Schematische Darstellung des Krankheitsmodells zur Induktion der myokardialen Ischämie/ Reperfusion in vivo durch experimentelle Ligatur der linken Koronararterie (LCA), **Rechts:** Zeitliches prospektives Studiendesign mit unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten sowie –methoden in $Dicer^{lox/lox}$ und $Dicer^{Pf4\Delta/Pf4\Delta}$ Mäusen

Wir konnten zeigen, dass sich in der akuten Phase der Inflammation nach myokardialer I/R und einem Tag Reperfusion kein signifikanter Unterschied zwischen $Dicer^{lox/lox}$ und $Dicer^{Pf4\Delta/Pf4\Delta}$

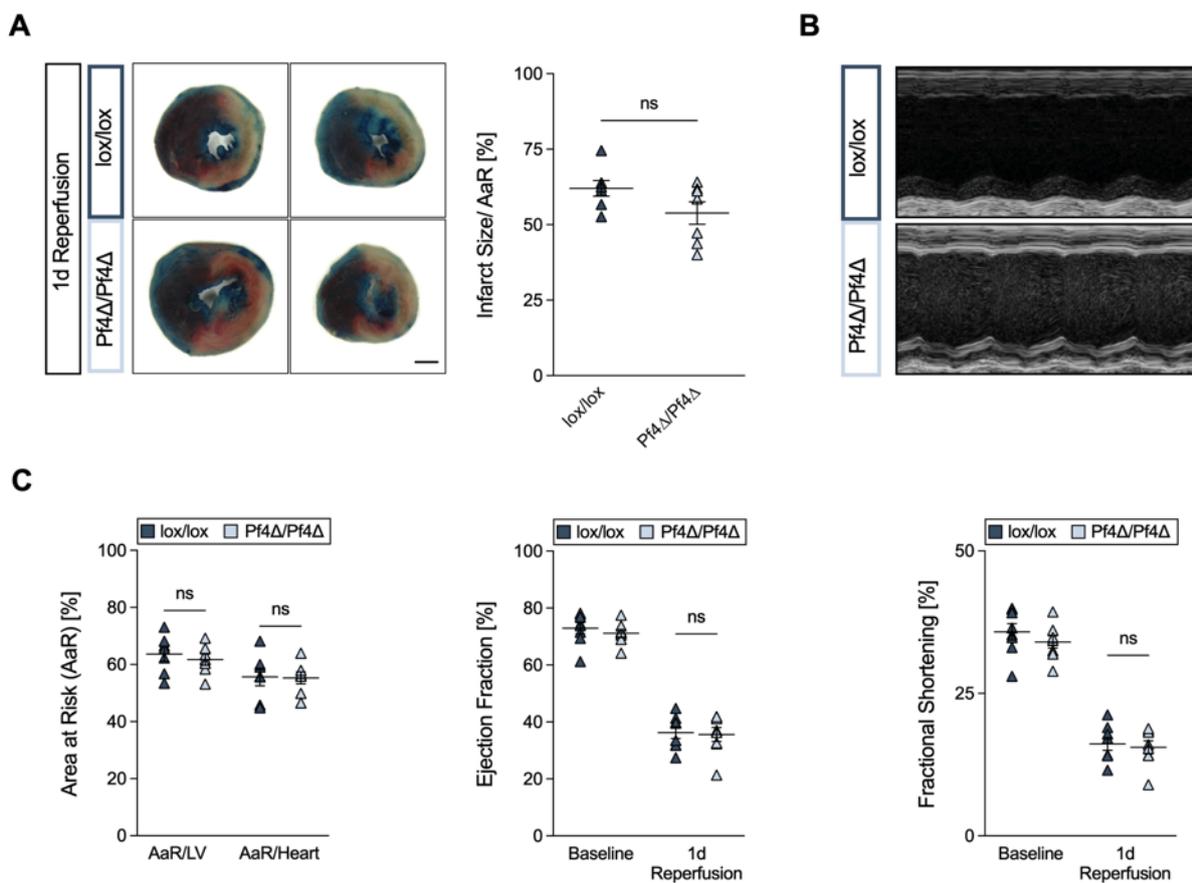


Abbildung 26: Einfluss der MK/ thrombozyten-spezifischen Deletion von Dicer auf die Infarktfläche und kardiale Funktion nach myokardialer I/R und einem Tag Reperfusion in der akuten Phase der Inflammation

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

A. Repräsentative Evans Blue/TTC Färbungen von transversalen Myokardschnitten in $Dicer^{lox/lox}$ und $Dicer^{Pf4\Delta/Pf4\Delta}$ Mäusen nach experimenteller LCA-Ligatur und einem Tag Reperfusion zur Darstellung der Infarktgröße (Weiß: Infarktgebiet, Rot + Weiß: Area at Risk (AaR), Blau: Area not at Risk), Maßstabsbalken entspricht 1 mm, Arithmetischer Mittelwert \pm SEM der Infarktgröße/ AaR (n=7, ungepaarter T-Test, p=0,0956), **B.** Repräsentative M-Mode Aufnahmen aus der parasternal langen Achse zur Darstellung der linksventrikulären Wandbewegung in $Dicer^{lox/lox}$ und $Dicer^{Pf4\Delta/Pf4\Delta}$ Mäusen einem Tag post myokardialer I/R, **C.** Quantifizierung der Area at Risk und kardialen Funktionsparametern in der Echokardiographie einem Tag post myokardialer I/R, Ejektionsfraktion, [p=0,9621]; Fraktionelle Verkürzung, [p=0,9225], (n=8, Two-Way ANOVA mit Sidak's Multiple Mittelwertvergleiche)

Ergebnisse

Dicer^{lox/lox} weder in Bezug auf die Infarktfläche noch in Bezug auf die kardialen Funktionsparameter in der Echokardiographie einstellte (Abb.: 27).

Dies änderte sich im weiteren zeitlichen Verlauf im Rahmen der reparativen und proliferativen Heilungsprozesse des Herzens in der späten inflammatorischen Phase. Nach myokardialer Ischämie und sieben Tagen Reperfusion zeigte sich eine signifikant vergrößerte Infarktfläche sowie kompromittierte kardiale Funktion mit signifikant reduzierter Ejektionsfraktion, Fraktionelle Verkürzung, Schlagvolumen und kardialen Auswurf in dem Mausmodell mit MK/thrombozyten-spezifischer Deletion von *Dicer* (Abb.: 28) [13].

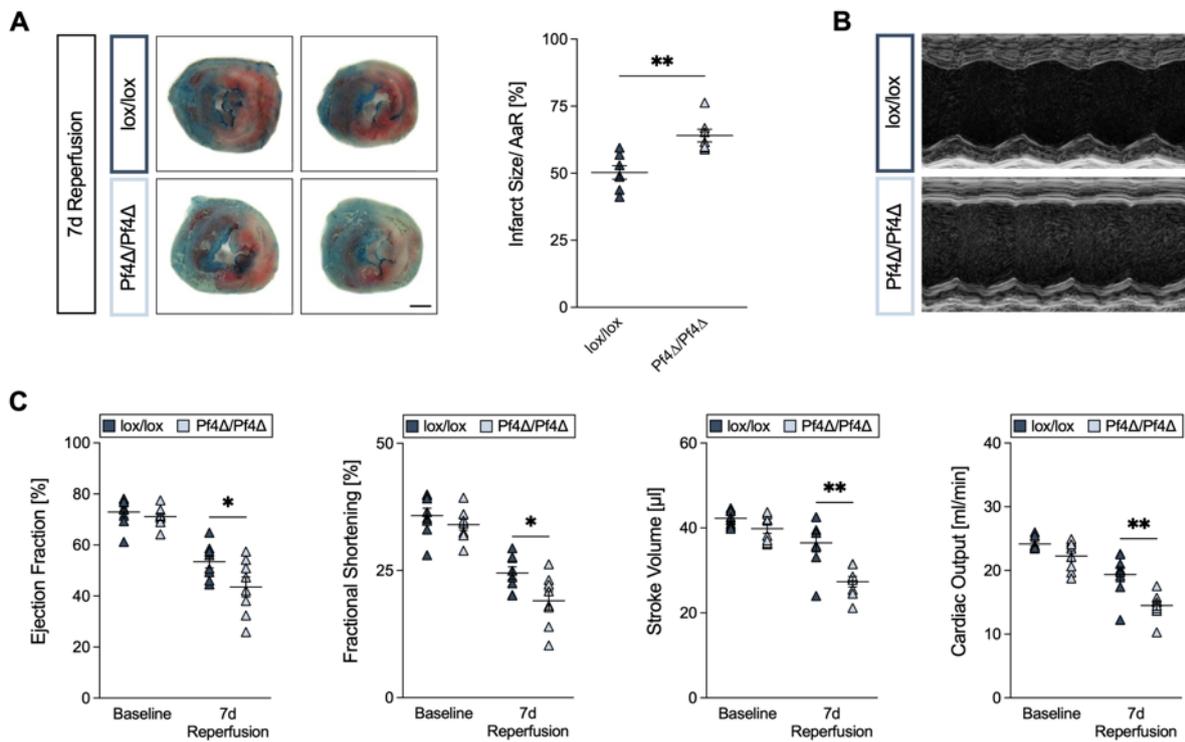


Abbildung 28: MK/thrombozyten-spezifische Deletion von *Dicer* führt zu einer signifikant größeren Infarktfläche und reduzierten kardialen Funktion nach myokardialer I/R und sieben Tage Reperfusion in der späten Phase der Inflammation
Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

A. Repräsentative Evans Blue/TTC Färbungen von transversalen Myokardschnitten in *Dicer*^{lox/lox} und *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen nach experimenteller LCA-Ligatur und sieben Tagen Reperfusion zur Darstellung der Infarktgröße (Weiß: Infarktgebiet, Rot + Weiß: Area at Risk (AaR), Blau: Area not at Risk), Maßstabsbalken entspricht 1 mm, Arithmetischer Mittelwert ± SEM der Infarktgröße/ AaR (n=7, ungepaarter T-Test, p=0,0017), **B.** Repräsentative M-Mode Aufnahmen aus der parasternalen langen Achse zur Darstellung der linksventrikulären Wandbewegung in *Dicer*^{lox/lox} und *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen sieben Tagen post myokardialer I/R, **C.** Kardialen Funktionsparameter in der Echokardiographie sieben Tage post myokardialer I/R, Ejektionsfraktion, [p=0,0230]; Fraktionelle Verkürzung, [p=0,0230]; Schlagvolumen, [p=0,0001]; Kardialer Auswurf, [p=0,0006]; (n=8, Two-Way ANOVA mit Sidak's Multiple Mittelwertvergleiche)

3.6 Thrombozytäre *Dicer*-abhängige miRNAs modulieren die myokardiale Immunzell-Infiltration nach experimenteller Ischämie und Reperfusion

Neben der signifikant vergrößerten Infarktfläche und reduzierten kardialen Funktion sieben Tage post myokardialer I/R in Mäusen mit MK/ thrombozyten-spezifischer Deletion von *Dicer* konnten wir in dieser Phase eine signifikant verstärkte Akkumulation und Aktivität inflammatorischer Zellen in *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen nachweisen (Abb.: 29) [13].

Ergebnisse

Zu diesem Anlass wurde unter Ketamin/ Xylazin Narkose und vorbereitendem Fastenprotokoll zur Suppression des myokardialen Metabolismus (s. Methoden) ein 2-[¹⁸F]-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose (kurz: [¹⁸F]FDG) über die Schwanzvene injiziert und in der Positronen-Emissions-Tomographie registriert. Die Akkumulation des [¹⁸F]FDG erfolgt unter diesen Bedingungen primär in infiltrierte inflammatorische Zellen und korreliert mit deren Metabolismus. Zur anatomischen Orientierung erfolgte zusätzlich die Bildgebung in der Magnetresonanztomographie.

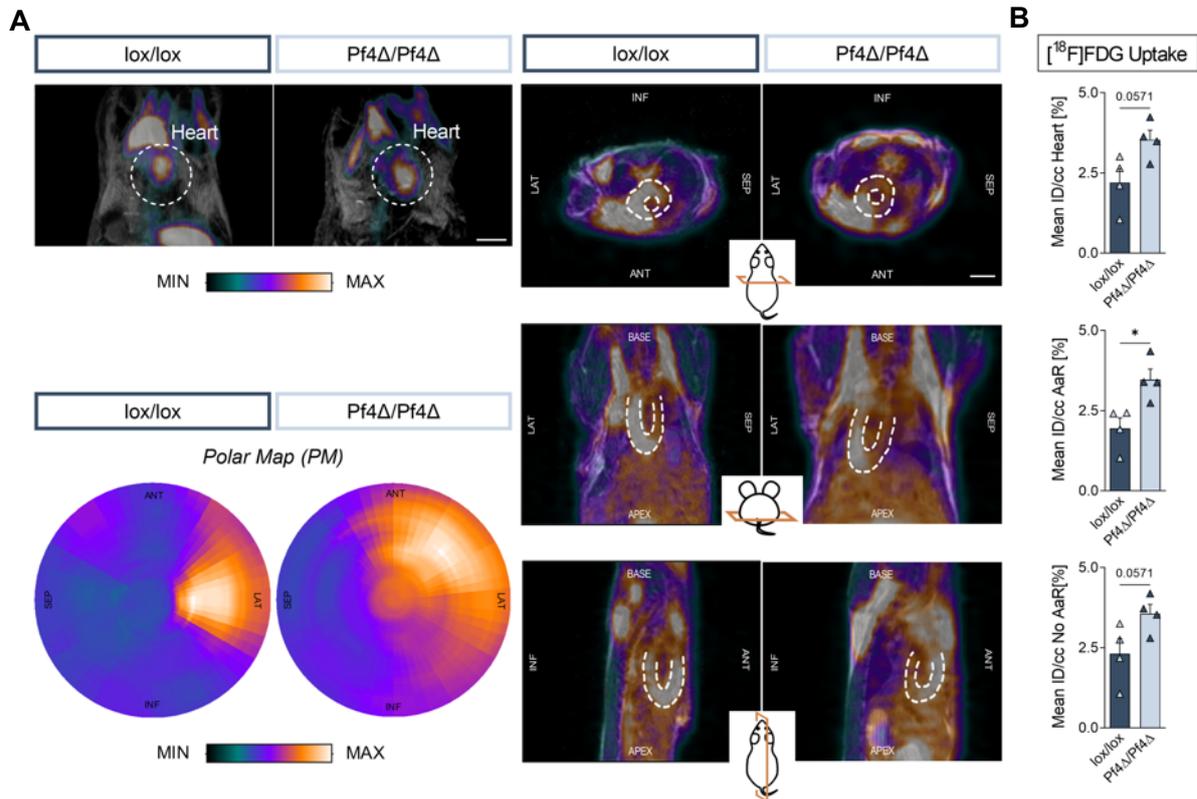


Abbildung 29: Signifikant erhöhte Immunzell-Infiltration im Myokard von Mäusen mit MK/thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al. [13]

A. Detektion der [¹⁸F]FDG Aufnahme durch inflammatorische Zellen im Myokard in der kombinierten PET-MRT nach Injektion eines 2-[¹⁸F]-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose Tracers in *Dicer^{lox/lox}* und *Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ}* Mäuse unter Ketamin/Xylazin Narkose und Fastenprotokoll nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion. Die repräsentative Polar Map zeigt die regionalen Verteilung der [¹⁸F]FDG Aufnahme im Herzen normalisiert zur injizierten Tracerdosis pro Kubikzentimeter (ID/cc). In den Piktogrammen wird das Herz in transversaler, koronarer und sagittaler Ebene dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 mm, **B.** Arithmetische Mittelwerte ± SEM (n=4, Mann-Whitney Test) der [¹⁸F]FDG Traceraufnahme im gesamten Herzen (p=0,0571) [Oben], AaR (p=0,0286) [Mitte], Area Not at Risk (p=0,0571) [Unten]. Die AaR umfasst folgende Regionen entsprechend des 17-Segemente-Modells der AHA: apex, apical septal, apical anterior, mid anteroseptal and mid anterior

Darüber hinaus konnten wir einen potentiellen Mechanismus der verstärkten myokardialen Immunzellrekrutierung in Dicer-defizienten Mäusen aufzeigen. So konnten wir nachweisen, dass Mäuse mit MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer zu einer signifikant erhöhten thrombozytären Oberflächenexpression von CD62 P-Selektin nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion neigen, was gleichzeitig mit einer verstärkten Koaggregation mit CD45⁺-Leukozyten einherging (Abb.: 30) [13].

Ergebnisse

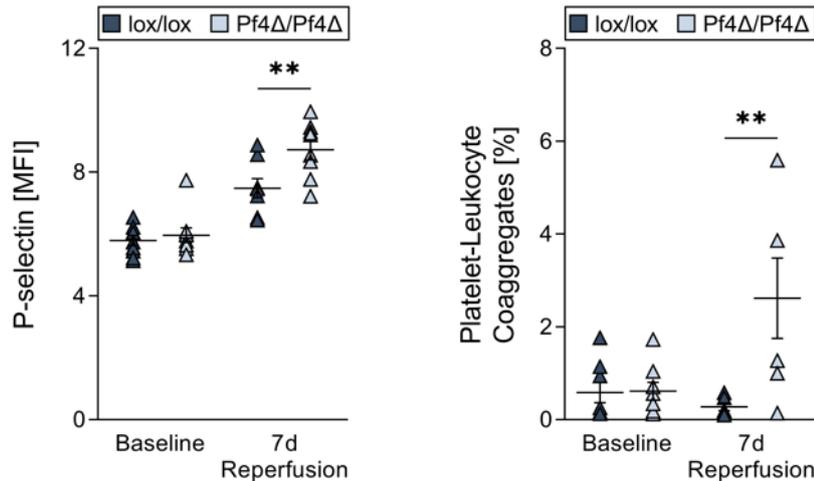


Abbildung 30: *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Thrombozyten weisen eine erhöhte CD62 P-Selektin Expression und eine verstärkte Koaggregation mit CD45⁺-Leukozyten nach myokardialer I/R und 7d Reperfusion auf

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ} Plättchen weisen einen hyperresponsiven Phänotypen mit erhöhter CD62 P-Selektin Oberflächenexpression und verstärkter Koagregat-Bildung mit CD45 positiven Leukozyten (PLCA) nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion auf. (n=12 für P-Selektin, n=6 für PLCA, 2-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test, 7d Reperfusion: p=0,0052 [P-Selektin] and p=0,0018 [PLCA])

3.7 Thrombozytäre miRNAs regulieren die Akkumulation von Blutplättchen und proinflammatorischen Monozyten/ Makrophagen in das Myokard

Ziel der folgenden Versuche war es, die Ursache für die signifikant erhöhte Immunzell-Infiltration in Mäusen mit *Dicer*-defizienten Thrombozyten zu charakterisieren und gleichzeitig die Art der rekrutierten Immunzellen zu phänotypisieren.

Zunächst konnte unter Anwendung moderner Light-Sheet-Fluoreszenz-Mikroskopie Methoden (kurz: LSM) gezeigt werden, dass die MK/ thrombozyten-spezifische Deletion von *Dicer* zu einer signifikant erhöhten Akkumulation von Thrombozyten im Bereich des reperfundierten Myokards nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion führt (Abb.: 31) [13].

In weiteren Versuchen war es möglich, den Einfluss dieser signifikant erhöhten Thrombusformation im Bereich des Myokards auf die inflammatorischen Vorgänge nach Ischämie und Reperfusion zu entschlüsseln.

So war es möglich, in einer myokardialen Durchflusszytometrie eine Immunphänotypisierung der in das Myokard infiltrierten Immunzellen durchzuführen und darüber einen präzisen Eindruck von den dynamischen inflammatorischen Vorgängen nach Myokardinfarkt und Reperfusion zu erhalten. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass thrombozytäre miRNAs eine zentrale Rolle in der Modulation der späten inflammatorischen Phase nach myokardialer Ischämie und Reperfusion spielen könnten.

Ergebnisse

So konnte gezeigt werden, dass sieben Tage nach myokardialer Ischämie und Reperfusion Mäuse mit MK/thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer eine signifikant erhöhte

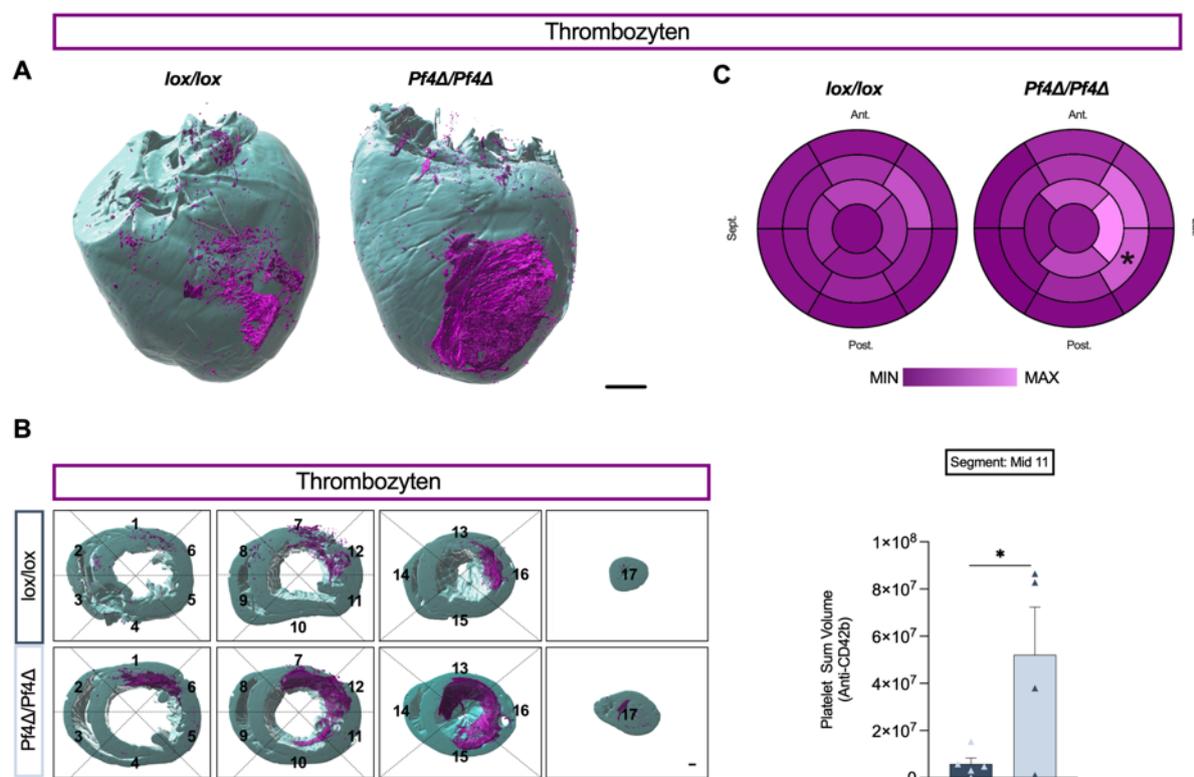


Abbildung 31: MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer führt zur signifikant verstärkten Akkumulation von Thrombozyten im Bereich des Myokards nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

A. Repräsentative dreidimensionale Rekonstruktion (LSFM) der Akkumulation von CD42b⁺-Thrombozyten in *Dicer*^{lox/lox} und *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen post myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion, Maßstabsbalken entspricht 1000 µm, **B.** Transversale Segmentierung des Herzens (Segmente: Apex, Apikal, Mid und Basal) und Einteilung nach dem 17-Herz-Segment-Modell der AHA mit Darstellung der CD42b⁺-Thrombozyten Akkumulation, Arithmetischer Mittelwert ± SEM der Thrombozytenakkumulation im Segment 11 (n=4, Ungepaarter T-Test, p=0,037), **C.** Arithmetischer Mittelwert ± SEM der Akkumulation von Thrombozyten im 17-Herz-Segment-Modell der AHA

Akkumulation von proinflammatorischen Ly6C^{High} Monozyten/ Makrophagen im geschädigten Myokard aufweisen, während in Mäusen mit unbeeinträchtigter thrombozytärer miRNA Biogenese in dieser Phase signifikant mehr antiinflammatorische Ly6C^{Low} Monozyten/ Makrophagen Populationen aufzufinden waren (Abb.: 32) [13].

Die MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer könnte demnach entweder primär zu einer verstärkten Rekrutierung dieser pro-inflammatorischen Zellpopulationen geführt haben, oder sekundär zu einer verspäteten phänotypischen Differenzierung der rekrutierten Ly6C^{High} Monozyten/ Makrophagen in den anti-inflammatorischen Ly6C^{Low} Zelltyp im Myokard geführt haben. Die erste Welle der primär durch Neutrophile Granulozyten dominierten Immunzell-Rekrutierung schien dabei von dem veränderten thrombozytären miRNA Profil unbeeinflusst geblieben zu sein, da sich weder nach einem Tag Reperfusion (Daten nicht gezeigt) noch nach sieben Tagen Reperfusion ein signifikanter Unterschied einstellte. Darüber hinaus konnten wir in in vitro Makrophagen-Migrations-Assays ein weiteres wichtiges Indiz für den ursächlichen Zusammenhang der Thrombozyten-Aktivität und der Rekrutierung von Immunzellen erbringen.

Ergebnisse

So konnte gezeigt werden, dass der Überstand von Thrombin-stimulierten Thrombozyten mit MK/thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer zu einer signifikant erhöhten Migration von murinen Raw246.7 Makrophagen in der Boyden-Kammer führte (Abb.: 33) [13].

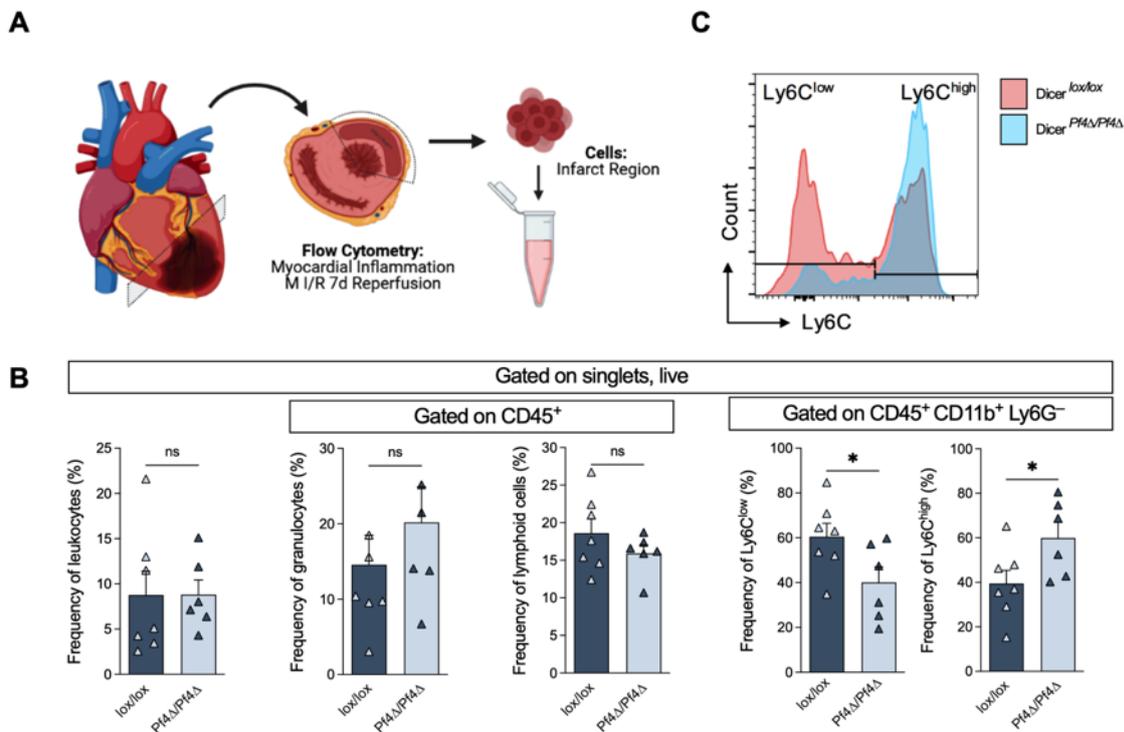


Abbildung 32: Thrombozytäre miRNAs regulieren die Monozyten-/ Makrophagen-spezifische Inflammation nach experimenteller myokardialer Ischämie und sieben Tagen Reperfusion

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

A. Schematische Darstellung des methodischen Vorgehens zur Untersuchung der myokardialen Inflammation in der Durchflusszytometrie, **B.** Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung der myokardialen Zellen in *Dicer^{lox/lox}* und *Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ}* Mäusen sieben Tagen nach myokardialer I/R in Folge transientser LCA-Ligatur (n=6, ungepaarter T-Test; p=0,2719 [Lymphozyten]; p=0,9924 [Leukozyten]; p=0,3755 [Neutrophile Granulozyten]; p=0,0464 [Ly6C^{High}]; p=0,0464 [Ly6C^{Low}]), Arithmetische Mittelwerte ± SEM, **C.** Repräsentatives Gate der Ly6C Monozyten/Makrophagen Oberflächenexpression in *Dicer^{lox/lox}* und *Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ}* Mäusen

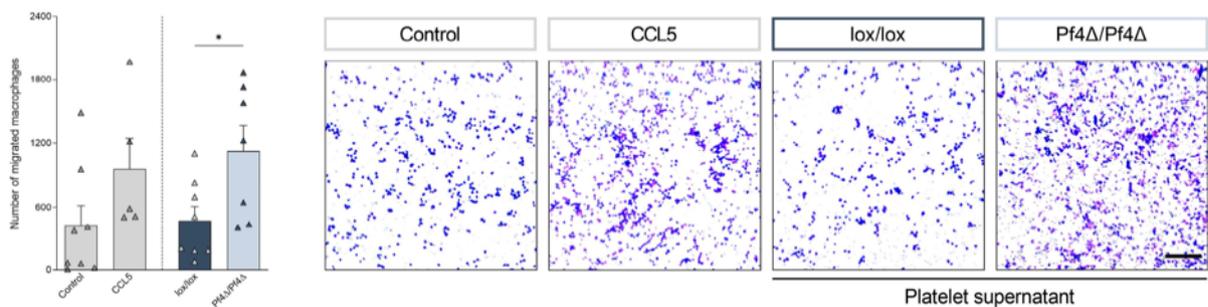


Abbildung 33: Der Überstand von Thrombin-stimulierten Dicer-defizienten Thrombozyten weist eine signifikant erhöhte migratorische Kapazität auf murine Raw 264.7 Makrophagen in vitro auf

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

Dargestellt sind die Ergebnisse aus Versuchen zum in vitro Migrationsverhalten der murinen Raw 264.7 Makrophagen Zelllinie in der Boyden-Kammer in Richtung Lösungskontrolle (Einschließlich Thrombin), Chemokin CCL5 (100 ng/ml) Positiv-Kontrolle und dem Überstand von Thrombin-stimulierten (0,1 U/ml) *Dicer^{lox/lox}* und *Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ}* Thrombozyten, Links: Arithmetische Mittelwerte ± SEM (n=8, Ungepaarter T-Test) der migrierten Makrophagen-Anzahl, Rechts: Repräsentative May-Grünwald/ Giemsa Färbungen von migrierten Raw 264.7 Makrophagen in Richtung chemotaktischem Agens, Maßstabsbalken entspricht 250 µm

Ergebnisse

Der chemotaktische Stimulus des durch das veränderte miRNA Profil beeinflussten Plättchenüberstandes war dabei sogar vergleichbar mit dem Einfluss der CCL-5 Positivkontrolle auf die Makrophagenmigration.

Die Ergebnisse legen eindrücklich einen möglichen wichtigen Einfluss von thrombozytären miRNAs auf die Prozesse der Thromboinflammation und Modulation der myokardialen Inflammation nach Ischämie und Reperfusion in vivo nahe.

3.8 Aufhebung der Dicer-abhängiger miRNA Prozessierung in Thrombozyten reduziert die Angiogenese und erhöht die Ausbildung von profibrotischen Myofibroblasten im Myokard nach I/R und sieben Tagen Reperfusion

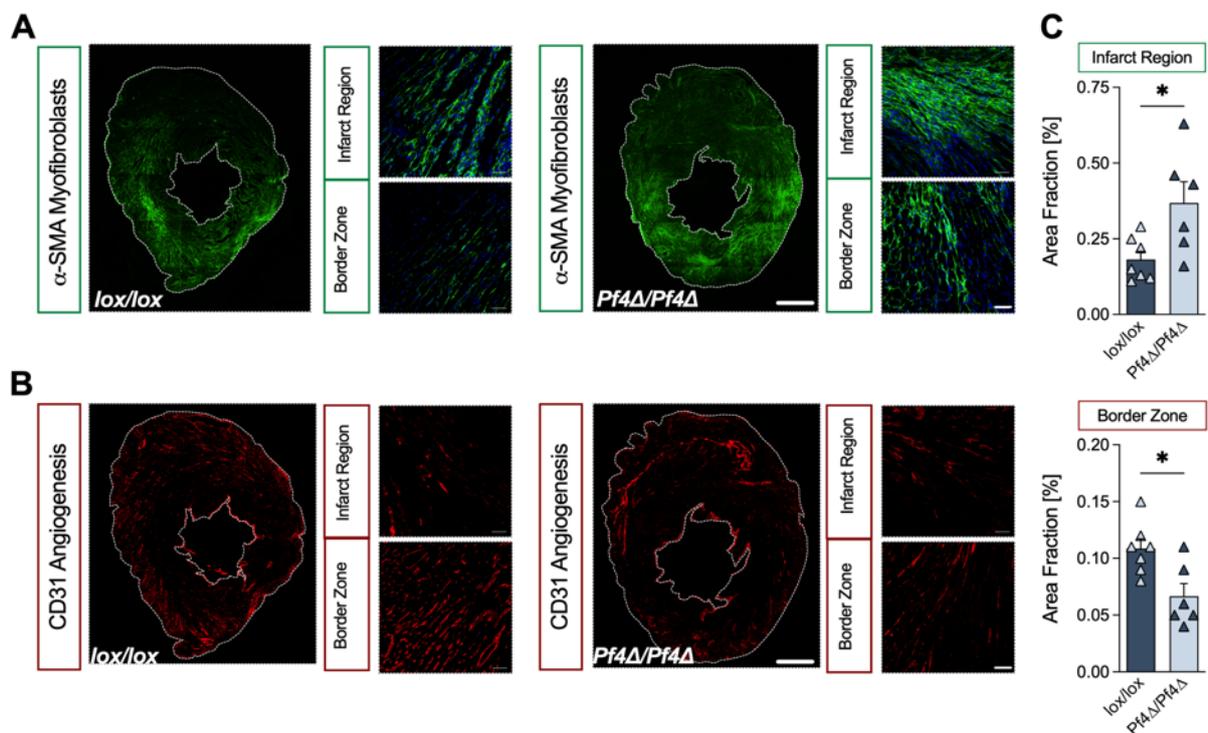


Abbildung 34: MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer beeinträchtigt die Angiogenese und erhöht die Ausbildung profibrotischer Myofibroblasten nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

A. Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von α -SMA positiven Myofibroblasten in der Infarktzone und Grenzzone des Herzens post myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion in *Dicer*^{lox/lox} und *Dicer*^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} Mäusen, Grün: α -SMA, Blau: Draq5, **B.** Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von CD31 positiven Endothelzellen (Rot) zur Darstellung der Angiogenese in der Infarktzone und Grenzzone des Herzens post myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion in *Dicer*^{lox/lox} und *Dicer*^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} Mäuse, **C.** Arithmetische Mittelwerte \pm SEM (n=6, Ungepaarter T-Test) des prozentualen Flächenanteils von Myofibroblasten (p=0,0227) und Endothelzellen (p=0,0115) im Bereich der Infarkt- bzw. Grenzzone; Maßstabsbalken entspricht 500 μ m [Übersichtsaufnahme] bzw. 50 μ m [Infarkt/ Grenzzone]

Die Angiogenese und Differenzierung von Fibroblasten zu α -SMA exprimierenden Myofibroblasten stellen zentrale Prozesse in der Proliferations- und Reparationsphase nach myokardialer Ischämie und Reperfusion dar.

Ergebnisse

Im Rahmen der folgenden Untersuchungen sollte der Einfluss des durch die MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer induzierten pro-inflammatorischen Plättchenphänotyps auf die Regulation dieser essentiellen Vorgänge dargestellt werden.

Zu diesem Anlass wurden histologische Proben von *Dicer*^{lox/lox} und *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen unter dem Konfokalmikroskop untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit MK/thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer eine signifikant erhöhte Akkumulation von α -SMA exprimierenden pro-fibrotischen Myofibroblasten im Infarktbereich und eine signifikant verstärkte Kapillarisation im Bereich der myokardialen Grenzzone zum Infarktbereich nach I/R und sieben Tagen Reperfusion aufwiesen (Abb.: 34) [13].

Die Akkumulation von α -SMA exprimierenden Myofibroblasten im Bereich der Grenzzone sowie die Kapillarisation im Bereich der Infarktzone war hingegen im Vergleich zur *Dicer*^{lox/lox} Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich.

3.9 Therapie mit dem reversiblen P2Y₁₂ Rezeptor-Antagonisten Ticagrelor schützt vor einer vergrößerten Infarktfläche in *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen

Um den Einfluss von Thrombozyten und deren modifizierten miRNA Expressionsprofil auf die Modulation der Inflammation nach myokardialer I/R besser zu verstehen, wurden die Versuche zusätzlich unter antithrombozytärer Therapie mit dem reversiblen P2Y₁₂ Rezeptor-Antagonisten Ticagrelor wiederholt.

Dazu wurden die Versuchstiere vor der experimentellen Induktion des Myokardinfarktes und nach dem Myokardinfarkt über einen Zeitraum von sieben Tagen wiederholt mit Ticagrelor (50 mg/kg) bzw. Lösungsmittelkontrolle behandelt (s. Methoden).

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Ticagrelor (50 mg/kg) vor der vergrößerten Infarktfläche und dem beobachteten negativen myokardialen Remodeling in Mäusen mit MK/thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer schützt (Abb.: 35) [13].

Dies zeigte sich nicht nur in den revidierten Unterschieden in der Infarktgröße zwischen *Dicer*^{lox/lox} und *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion, sondern darüber hinaus eindrücklich in einer signifikant verbesserten Ejektionsfraktion, Fraktionierten Verkürzung, Schlagvolumen und kardialen Auswurf in Mäusen mit MK/thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer und Ticagrelor Behandlung [13].

Ergebnisse

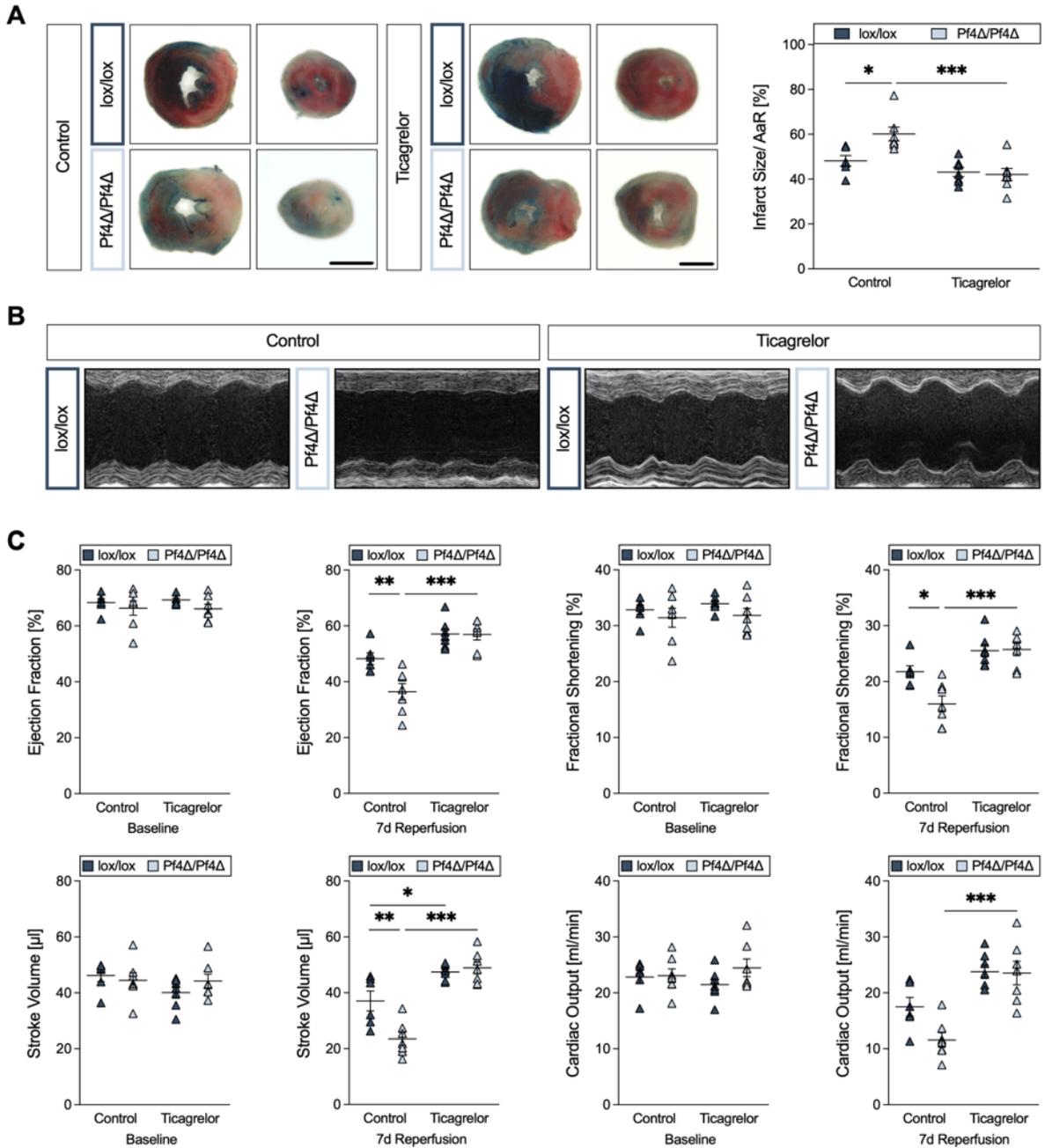


Abbildung 35: Behandlung mit dem reversiblen P2Y₁₂ Rezeptor-Antagonisten Ticagrelor schützt vor einer vergrößerten Infarktfläche und negativem Remodeling in Mäusen mit MK/ thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

A. Repräsentative Evans Blue/TTC Färbungen von transversalen Myokardschnitten in *Dicer^{lox/lox}* und *Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ}* Mäusen nach experimenteller LCA-Ligatur und sieben Tagen Reperfusion unter Behandlung mit Ticagrelor (50 mg/kg) bzw. Lösungsmittelkontrolle zur Darstellung der Infarktgröße (Weiß: Infarktgebiet, Rot + Weiß: Area at Risk (AaR), Blau: Area not at Risk), Maßstabsbalken entspricht 1 mm, Arithmetischer Mittelwert ± SEM der Infarktgröße/ AaR (n=6-7, ungepaarter T-Test, $p_1=0,0244$, $p_2=0,0003$), **B.** Repräsentative M-Mode Aufnahmen aus der parasternalen Achse zur Darstellung der linksventrikulären Wandbewegung in *Dicer^{lox/lox}* und *Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ}* Mäusen sieben Tage post myokardialer I/R unter Behandlung mit Ticagrelor (50 mg/kg) bzw. Lösungsmittelkontrolle, **C.** Kardialen Funktionsparameter in der Echokardiographie unter Baseline Bedingungen und sieben Tage post myokardialer I/R unter Behandlung mit Ticagrelor (50 mg/kg) bzw. Lösungsmittelkontrolle, (n=6-7, 2-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test, 7d Reperfusion: $p_1=0,0091$, $p_2<0,0001$ [Ejektionsfraktion]; $p_1=0,0180$, $p_2<0,0001$ [Fraktionierte Verkürzung]; $p_1=0,0319$, $p_2=0,0032$, $p_3<0,0001$ [Schlagvolumen]; $p_1=0,0001$ [Kardialer Auswurf]).

3.10 Aufhebung der Dicer-abhängigen miRNA Prozessierung in Plättchen führt zu einer verstärkten Narbenbildung und negativen Remodeling

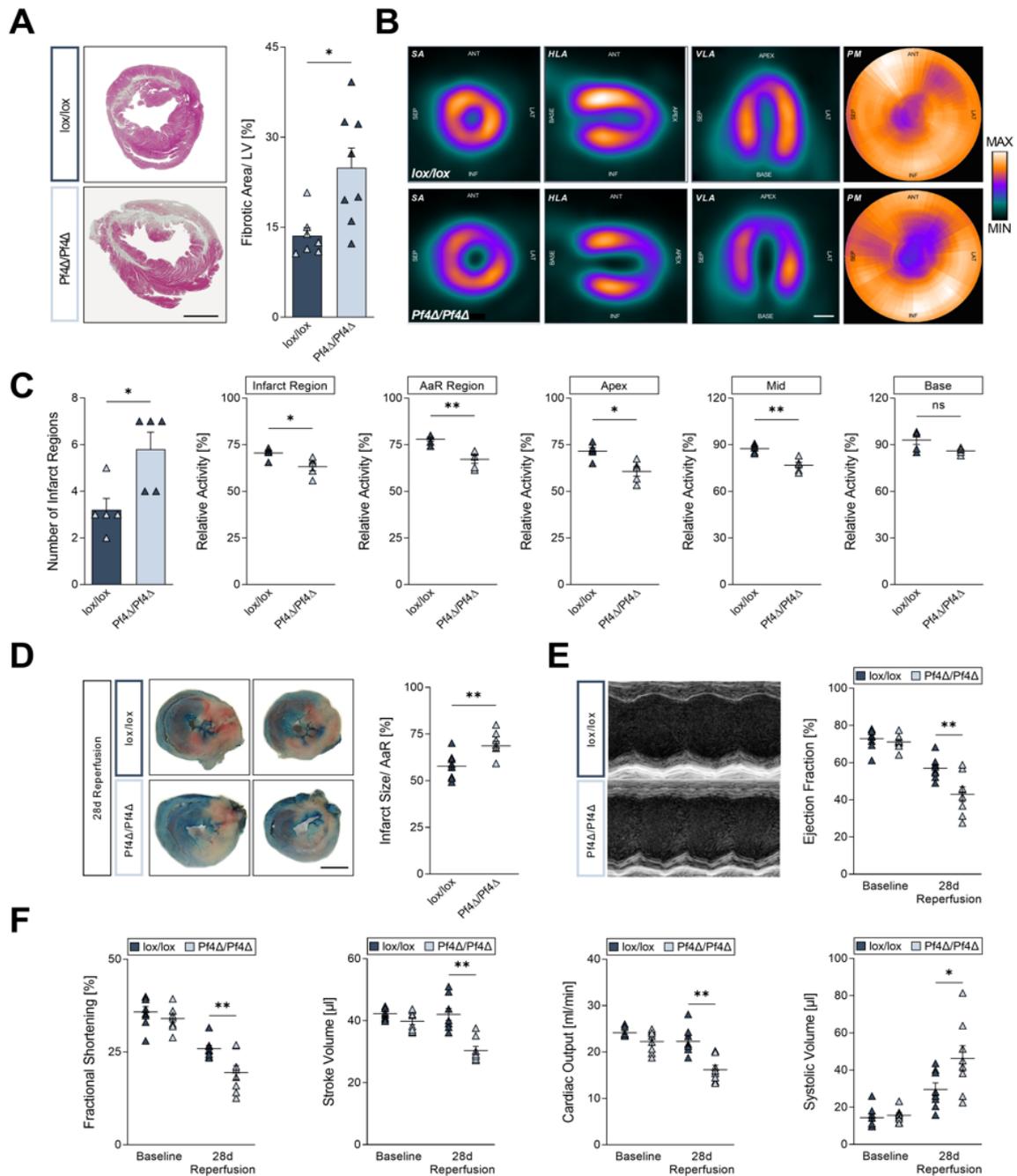


Abbildung 36: MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer führt zu einer aggravierten fibrotischen Narbenformation und langfristig reduzierter kardialer Funktion nach myokardialer I/R und 28 Tagen Reperfusion

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13] **A.** Abbildungen und arithmetische Mittelwerte \pm SEM der myokardialen Fibrose in der Masson-Trichrom-Färbung post myokardialer I/R und 28d Reperfusion (n=7, Ungepaarter T-Test, p=0,0101), Maßstabsbalken entspricht 2 mm, **B.** Detektion der [18 F]FDG Aufnahme im Myokard in der PET unter Isofluran-Narkose, Regionen mit reduzierter [18 F]FDG Aufnahme stellen Segmente mit beeinträchtigtem Glukose Metabolismus aufgrund von Narbenbildung nach myokardialer I/R dar, **C.** Arithmetische Mittelwerte \pm SEM der Anzahl der Infarktregionen (p=0,0238) sowie metabolische Aktivität in der Infarktregion (p=0,0317) bzw. Area At Risk [AaR] (p=0,0079), (n=5, Mann-Whitney Test); n=5 Mann-Whitney Test, p=0,0159 [Apex], p=0,0079 [Mid], p=0,1508 [Base]), **D.** Evans Blue/TTC Färbungen von transversalen Myokardschnitten in *Dicer^{lox/lox}* und *Dicer^{P14Δ/P14Δ}* Mäusen zur Darstellung der Infarktgröße 28d post I/R (Weiß: Infarktgebiet, Rot + Weiß: Area at Risk (AaR), Blau: Area not at Risk, Maßstabsbalken entspricht 2 mm, Arithmetischer Mittelwert \pm SEM der Infarktgröße (n=8, Ungepaarter T-Test, p=0,0082), **E.** M-Mode Aufnahmen aus der parasternal langen Achse zur Darstellung der linksventrikulären Wandbewegung 28d post I/R, **F.** Ergebnisse Echokardiographie 28d post I/R (n=8, 2-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test, 28d Reperfusion: p=0,0054 [Fraktionierte Verkürzung], p<0,0001 [Schlagvolumen], p=0,0003 [Kardialer Auswurf], p=0,0139 [Systolisches Volumen]).

Ergebnisse

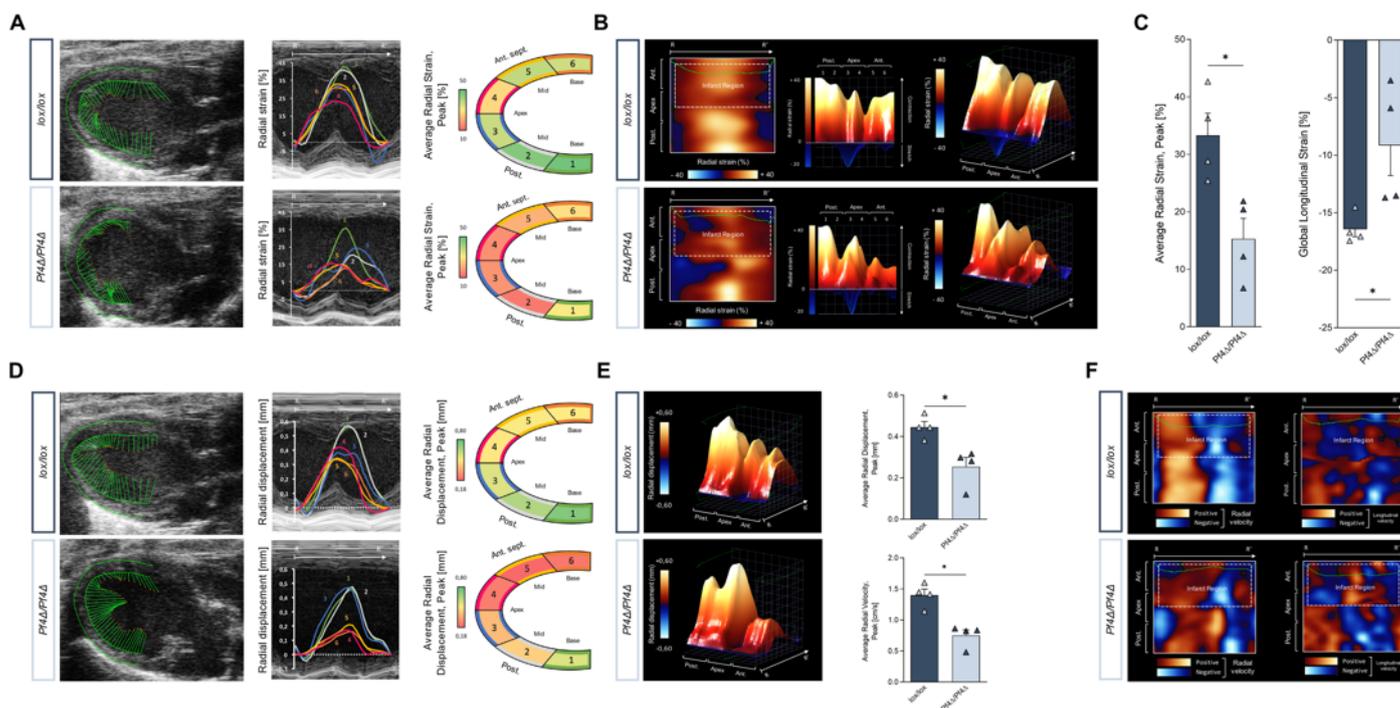


Abbildung 37: Mäuse mit MK/ thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer weisen langfristig ein nachteiliges myokardiales Remodeling nach experimenteller LAC-Ligatur und Reperfusion über 28 Tage auf

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

A. Repräsentative Speckle-Tracking-Echokardiographie (STE)-basierte Analyse der LV Funktion in *Dicer^{lox/lox}* und *Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ}* Mäusen (n=4) an d28 post MI. Links: Parasternale lange Achse B-Mode, Vektoren: Radialer Strain, Mitte/Rechts: Segmentaler radialer Strain in der parasternalen Achse: 1, basal-posterior; 2, mid-posterior; 3, apical-posterior; 4, apical-anteroseptal; 5, mid-anteroseptal; 6, basal-anteroseptal, **B.** Repräsentative Darstellung des radialen myokardialen Strain zur Analyse der durch den Infarkt induzierten regionalen Wanddeformität, Links: 2-dimensionale Ansicht; Mitte/Rechts: Radial Strain in 3-dimensionaler Ansicht, **C.** Arithmetische Mittelwerte + SEM (n=4) der STE-basierten funktionellen Parameter für die LV Funktion (n=4, Mann-Whitney Test, p=0,0286 [Average Radial strain], p=0,0286 [Global Longitudinal strain]), **D.** Repräsentative B-Mode Analyse des radialen displacement sowie Segmentierung des radialen displacement in der parasternalen Achse, **E.** Repräsentative Darstellung des radialen myokardialen displacement und velocity zur Analyse der durch den Infarkt induzierten regionalen Wanddeformität in 3-dimensionaler Ansicht, n=4 Mann-Whitney Test p=0,0286 [Average Radial Displacement], p=0,0286 [Average Radial Velocity], **F.** Repräsentative 2-dimensionale Ansicht der radialen bzw. longitudinalen Geschwindigkeit 28d post-MI

Ziel der im Folgenden dargestellten Versuche war die Untersuchung der langfristigen Auswirkungen der MK/thrombozyten-spezifischen Deletion von Dicer nach myokardialer I/R auf die strukturellen Umbauprozesse im Herzen im Rahmen des myokardialen Remodelings.

Die Ablation der thrombozytären miRNA Biogenese kulminierte in einer signifikant vergrößerten fibrotischen Narbe in der Masson-Trichrom-Färbung sowie einem vergrößerten Perfusionsdefekt der apikalen und antero-lateralen Wand in der [¹⁸F]FDG-PET-MRT nach myokardialer I/R und 28 Tagen Reperfusion (Abb.: 36 A/B) [13].

Darüber hinaus zeigten *Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ}* Mäuse eine signifikant größere Infarktfläche und entsprechende funktionelle Restriktionen in der Echokardiographie nach 28 Tagen (Abb.: 36 C-E). *Dicer*-defiziente Mäuse wiesen eine signifikant reduzierte linksventrikuläre systolische Funktion mit vermindertem Schlagvolumen und kompromittiertem kardialen Index auf (Abb.: 36 F). Zusätzlich zeigte sich nach 28 Tagen eine Dilatation des linken Ventrikels mit einem erhöhten systolischen Volumen in der zweidimensionalen (2D) B-Mode Auswertung als Hinweis auf eine progrediente Herzinsuffizienz (Abb.: 36 F) [13].

Zur präzisen Evaluation und segmentalen Auflösung der kardialen Remodeling-Prozesse nach 28 Tagen Reperfusion erfolgte eine 2D-Speckle-Tracking Echokardiographie (STE) mit Strain

Ergebnisse

Analyse. In der Auswertung der longitudinalen und radialen STE-basierten segmentalen Analyse der linksventrikulären Funktion (Abb.: 37 A-F) konnte ein global reduzierter longitudinaler Strain sowie ein reduzierter antero-septaler Strain im Bereich des Infarktgebietes von Mäusen mit MK/ thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer nachgewiesen werden (Abb.: 37 A-C). Darüber hinaus zeigte sich eine signifikant erhöhte linksventrikuläre Dyssynchronität als Folge einer erhöhten Infarktgröße und einem nachteiligen myokardialen Remodeling (Abb.: 37 C) [13].

Dicer^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäuse zeigten nach myokardialer I/R und 28 Tagen Reperfusion signifikant mehr myokardiale Segmente, die in ihrer systolischen Funktion im Vergleich zu *Dicer*^{lox/lox} Mäusen in Folge des Infarktes eingeschränkt waren (Abb.: 37 D-F). Interessanterweise ließen sich die Auswirkungen und segmentalen Veränderungen des Infarktes nicht nur auf den Infarktbereich selbst, sondern auch darüber hinaus in nicht-infarzierte myokardiale Segmente nachweisen. So konnte die Speckle-Tracking basierte echokardiographische Auswertung des radialen displacements und Geschwindigkeit konnte eine signifikant reduzierte linksventrikuläre Funktion und ausgeprägte kardiale Wanddeformitäten mit nachteiligem Remodeling in den infarzierten apikalen und antero-septalen Myokardsegmenten und darüber hinaus in den nicht-infarzierten basal-inferioren und mid-inferioren Segmenten von Dicer-defizienten Mäusen demonstrieren (Abb.: 37 E-F). Die größere regionale Distribution dieses Schädigungsmuster könnte das Substrat für die entstehende systolische Herzinsuffizienz darstellen.

3.11 Differentielle Dicer-abhängige Regulation thrombozytärer miRNAs nach myokardialer I/R

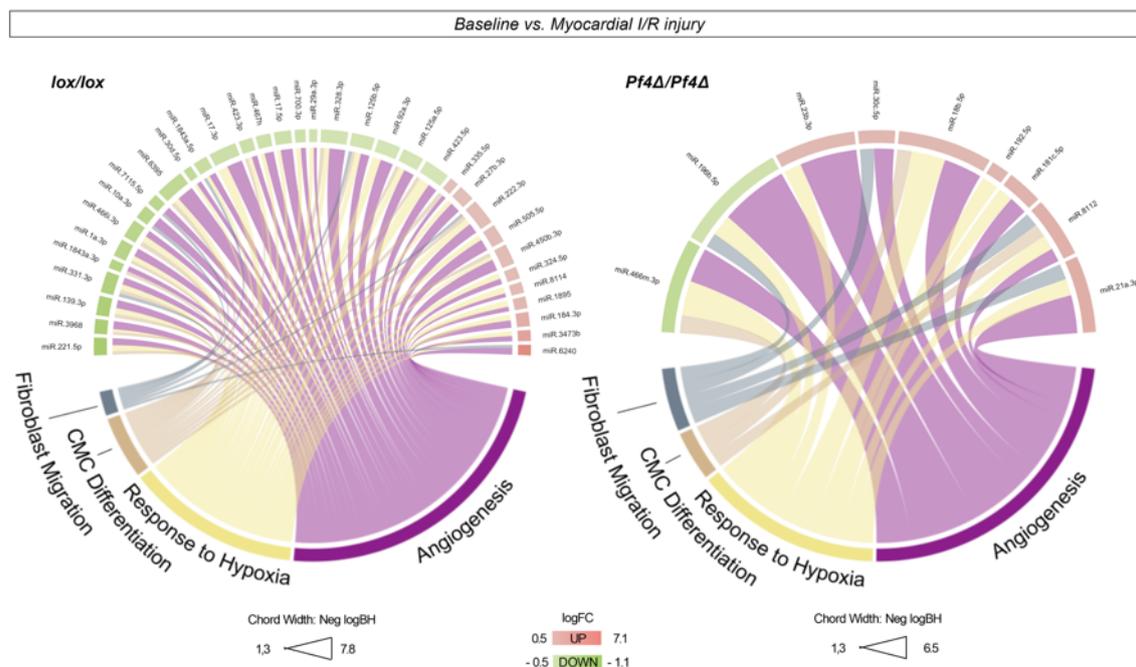


Abbildung 38: Funktionelle Prädiktionsanalyse von differentiell nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion regulierten thrombozytären miRNAs in *Dicer*^{lox/lox} oder *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

Die Chord-Diagramme zeigen ausgewählte Kategorien signifikant überrepräsentierter Gen Ontologien von thrombozytären miRNAs, die signifikant und ausschließlich in *Dicer*^{lox/lox} Mäusen (Links) oder *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen (Rechts) post 7d nach myokardialer I/R reguliert waren. Signifikant herunterregulierte miRNAs sind grün gekennzeichnet, signifikant aufregulierte miRNAs sind rot gefärbt. CMC: Kardiale Muskelzellen

Diskussion

Um thrombozytäre miRNAs, die differentiell in Reaktion auf die myokardiale Ischämie und Reperfusion reguliert sind, zu detektieren und damit potentiell wichtige Regulatoren für die beobachteten pathophysiologischen Prozesse der myokardialen Inflammation und Remodeling aufzudecken, wurden Next-Generation-Sequencing-Analysen sowohl vor der Induktion des experimentellen Myokardinfarktes (Baseline) als auch sieben Tage nach myokardialer Ischämie und Reperfusion in *Dicer*^{lox/lox} oder *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen durchgeführt.

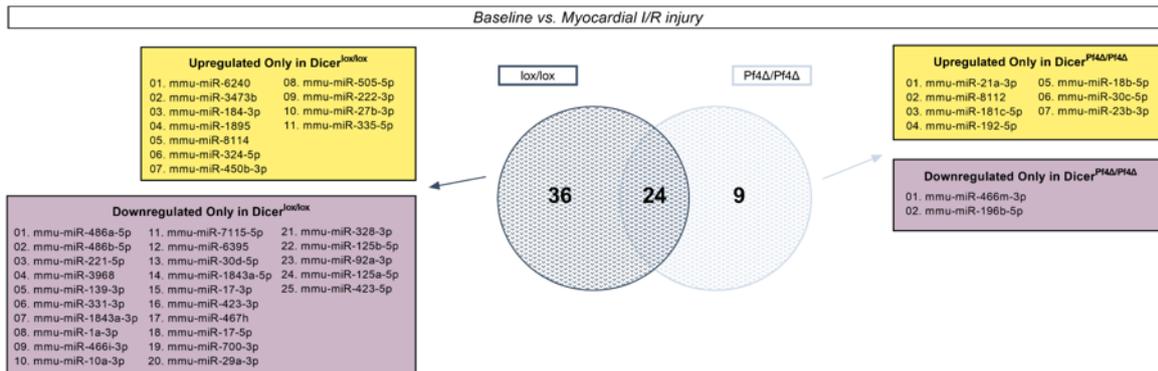


Abbildung 39: Mengendiagramm zur Analyse der differentiellen miRNA Regulation in Thrombozyten von *Dicer*^{lox/lox} oder *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

Auswahl der für die weitere funktionelle Prädiktionsanalyse berücksichtigt thrombozytären miRNAs auf Grundlage eines Mengendiagramms. Dargestellt sind die miRNAs, die ausschließlich und signifikant in *Dicer*^{lox/lox} oder *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen in Reaktion auf die myokardiale I/R und sieben Tagen Reperfusion reguliert waren. Die differentielle Expression wurde ab einem FDR<0,05 als signifikant betrachtet. Aufregulation logFC>0,5; Runterregulation logFC<-0,05

Wie in Abb.: 39 dargestellt, waren 11 miRNAs auf- und 25 miRNAs herunterreguliert in *Dicer*^{lox/lox} Mäusen nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion ohne eine signifikante Regulation in *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen aufzuweisen. In *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen konnten zu diesem Zeitpunkt 7 auf- und 2 exklusiv herunterregulierte miRNAs detektiert werden, ohne eine relevante Regulation in *Dicer*^{lox/lox} Mäusen aufzuweisen [13].

Die exklusiv in dem entsprechenden Mausmodell regulierten thrombozytären miRNAs wurden anschließend für die funktionelle Prädiktionsanalyse und potentiellen Assoziation mit in der myokardialen Inflammation relevanten Prozessen wie der Angiogenese, Reaktion auf Hypoxie, Differenzierung kardialer Muskelzellen und Fibroblastenmigration berücksichtigt und in einem Chord-Diagramm visualisiert (Abb.: 38).

4 Diskussion

Trotz großer Fortschritte in der interventionellen und pharmakologischen Therapie des akuten Myokardinfarktes durch frühe und effektive Reperfusion stellt die ischämische Kardiomyopathie und die progrediente Herzinsuffizienz in Folge einer unzureichenden Wiederherstellung der myokardialen Funktionalität eine zunehmende langfristige Folge mit erheblicher Morbidität und Mortalität für die Patienten dar [268].

Die reparativen Heilungsprozesse im Herzen nach myokardialer Ischämie und Reperfusion sind komplex und umfassen neben den chronologisch aufeinander abfolgenden Phasen der

Diskussion

Initiierung und Auflösung der Inflammation die Angiogenese sowie grundlegende strukturelle Umbauprozesse im Rahmen des myokardialen Remodelings.

MiRNAs haben eine zentrale Rolle in der Regulation und posttranskriptionellen Modulation dieser Vorgänge und könnten daher eine Schlüsselfunktion zu einem besseren Verständnis über die regenerativen und reparativen Prozesse im Herzen nach Myokardinfarkt einnehmen [301].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals den Einfluss thrombozytärer miRNAs und die biologische Relevanz eines funktionellen Dicer-abhängigen miRNA Biosynthesewegs in Megakaryozyten/ Thrombozyten für die myokardiale Inflammation und das ventrikuläre Remodeling nach experimenteller Ischämie und Reperfusion im Herzen nachweisen.

Die RNase III Dicer stellt eine Endoribonuklease dar, die eine zentrale Rolle in der funktionellen Reifung der pre-miRNA in die funktionell aktive reife miRNA übernimmt. Studien konnten zeigen, dass die Ablation der Dicer-abhängigen miRNA Biogenese die T-Zell abhängige Immunantwort beeinflusst und die Atherosklerose durch Unterstützung der Inflammation und Akkumulation von Lipiden in läSIONalen Makrophagen beschleunigt [296, 302]. Darüber hinaus konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass der funktionelle Verlust von Dicer in Thrombozyten von Patienten mit Diabetes mellitus mit einer verstärkten Plättchenaggregation und Thrombusformation einhergeht [303]. Insbesondere der letzte Punkt konnte in unserem Tiermodell unabhängig reproduziert werden, was den möglichen translationalen Charakter unserer weiteren Forschungsergebnisse hervorhebt.

Durch moderne Next-Generation-Sequencing Methoden konnten wir erstmals detailliert das miRNA Repertoire in murinen Thrombozyten aufschlüsseln und zeigen, dass die Pf4-gesteuerte MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer zu einer signifikanten differentiellen Regulation von ca. 24% des insgesamt 427 miRNAs umfassenden miRNA Repertoires in Thrombozyten führt. Der Grund für diesen verhältnismäßig geringen quantitativen Einfluss der Pf4-Promotor-gesteuerten Dicer-Deletion könnte darin zu finden sein, dass ein Großteil der miRNA Biogenese bereits auf megakaryozytärer Ebene noch vor der Expression des Pf4-Promotors stattfindet und daher unbeeinflusst von der Deletion bleibt [299].

Dennoch reicht dieser verhältnismäßig geringe Anteil an signifikant differentiell regulierten miRNAs aus, um maßgeblich den thrombozytären Phänotypen zu verändern. Der Grund für dieses Phänomen könnte darin liegen, dass jede einzelne miRNA eine Vielzahl von potentiellen mRNAs binden und deren Translation modulieren kann. Dadurch entsteht ein komplexes regulatorisches Netzwerk, in dem bereits scheinbar geringfügige Änderungen, wie in anderen Studien beobachtet eine Reduktion um bereits 20% im miRNA Expressionslevel, einen relevanten Krankheitsphänotypen hervorrufen können [304, 305]. Die funktionelle Relevanz der posttranskriptionellen Regulation durch miRNAs in Thrombozyten wird umso deutlicher, wenn man bedenkt, dass Thrombozyten als anukleäre Zellen über keine Möglichkeit der de novo DNA-Biosynthese verfügen, aber dennoch mit ihrem im Umfang begrenzten Transkriptom auf zahlreiche dynamische Veränderungen in ihrer Umgebung durch Anpassung ihrer Expressionsleistung reagieren müssen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass die MK/ thrombozyten-spezifische Beeinträchtigung der Dicer-abhängigen miRNA Biogenese zu einer signifikant vergrößerten

Diskussion

Infarktfläche nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion sowie einem negativen ventrikulären Remodeling im Langzeitverlauf führt. Insbesondere die verstärkte pro-inflammatorische Phase, die eingeschränkte Angiogenese sowie die signifikante Zunahme der kardialen Fibrose deuten auf eine wichtige regulatorische Funktion thrombozytärer miRNAs auf die Modulation der bei der myokardialen Heilung beteiligten zellulären Prozesse hin.

Auch wenn die Dicer-Expression unseren Erkenntnissen zu Folge in unserem transgenen Mausmodell nicht detektierbar unterschiedlich in nicht-thrombozytären Zelltypen wie Kardiomyozyten und Monozyten war, muss an dieser Stelle als potentielle Limitation dieser Studie darauf hingewiesen werden, dass neueren Erkenntnissen zu Folge Pf4 nicht ausschließlich auf Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert wird. Daher können selbst in dem in unserem Fall verwendeten hoch-spezifischen Pf4-Cre/loxP-Mausmodell Auswirkungen durch nicht-thrombozyten-spezifische Nebeneffekte auf den beobachteten Phänotypen nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Thrombozyten spielen eine zunehmend beachtete Rolle als kritische Regulatoren in den Prozessen der myokardialen Inflammation nach I/R. Wir konnten im Rahmen unserer Arbeit zeigen, dass Thrombozyten nicht nur im relevanten Ausmaß im Bereich des reperfundierten Myokards akkumulieren, sondern dass deren Dicer-abhängig verstärkte Aggregation im Bereich des Infarktes mit einer verstärkten und potentiell prolongierten Akkumulation von pro-inflammatorischen Ly6C^{high} Monozyten/Makrophagen assoziiert ist. Diese Beobachtungen legen in Kombination mit unseren Ergebnissen zur in vitro Makrophagen-Migration einen zentralen Einfluss von Thrombozyten und deren miRNAs auf die Rekrutierung und Modulation der myokardialen Inflammation sehr nahe.

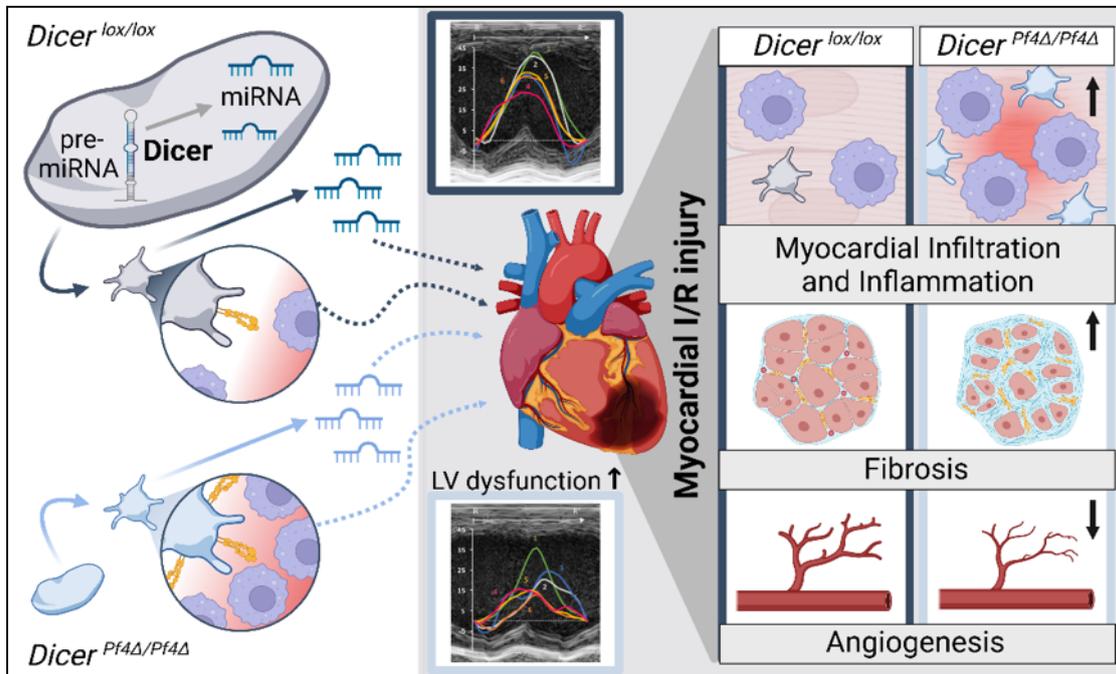


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Mechanismen und Auswirkungen der MK/thrombozyten-spezifischen Ablation der Dicer-abhängigen miRNA Biogenese auf das Herz nach myokardialer I/R
 Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

Nach einem akuten Myokardinfarkt stellt die zeitliche Auflösung der initialen Inflammation eine wichtige Grundvoraussetzung für die Einleitung der Proliferations- und Reparationsphase des geschädigten Myokards dar [52]. Eine durch das veränderte thrombozytäre miRNA Profil chronisch prolongierte pro-inflammatorische Phase könnte sich negativ auf die

Diskussion

darauffolgenden reparativen Phasen der Inflammation auswirken und dadurch die kompromittierte Angiogenese sowie verstärkte Differenzierung von α -SMA⁺-Myofibroblasten in Mäusen mit gestörter MK/thrombozyten-spezifischer miRNA Biogenese erklären. So wird in diesen frühen Phasen der myokardialen Inflammation der Grundstein für das in späteren Phasen beobachtete negative ventrikulären Remodeling und die Entwicklung zu einer progressiven Herzinsuffizienz gelegt.

Es gibt zahlreiche Mechanismen, über die thrombozytäre miRNAs direkt und indirekt Einfluss auf Ihre zelluläre Umgebung nehmen können. Zum einen nehmen miRNAs zunächst primär Einfluss auf die zelleigene Homöostase und können durch posttranskriptionelle Modulation der eigenen Genexpression einen zellulären Phänotyp induzieren, der sekundär eine veränderte Interaktion mit der zellulären Umgebung aufweist. So konnten wir beispielhaft zeigen, dass der Plättchenphänotyp abhängig von dem thrombozytären miRNA Profil ist und dass die MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer zu einer veränderten P-Selektin abhängigen Immunzellrekrutierung und über die veränderte Expression von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Oberflächenrezeptoren zu einem hyperresponsivem thrombozytären Phänotyp mit einer veränderten Umweltinteraktion führt.

Zum anderen können thrombozytäre miRNAs nach myokardialer Ischämie über spezialisierte vesikuläre Transportmechanismen in Form von Platelet-Microparticles (PMPs) in Zellen ihrer Umgebung transferieren und dort durch Modulation der zellfremden Genexpression direkt Einfluss auf Ihre zelluläre Umgebung nehmen [137, 256]. Studien konnten zeigen, dass Thrombozyten mit 41-45% eine der Hauptquellen für im Blut zirkulierende miRNAs darstellen und damit den Anteil der aus Leukozyten (28%) und Endothelzellen (8%) stammenden zirkulierenden miRNAs deutlich überschreiten [4].

Auch wenn die Modulation des thrombozytären miRNA Profils durch Ablation der Dicer-abhängigen miRNA Biogenese mit Blick auf vergleichbare Mechanismen in humanen Patientenstudien [303] einen translationalen Bezug und damit eine Stärke unserer Studie darstellt, so ist sie gleichzeitig auch deren größte Limitation, wenn es darum geht die funktionelle Bedeutung und biologische Relevanz einzelner signifikant regulierter miRNAs für den beobachteten Phänotypen zu entschlüsseln.

Dennoch ist es uns gelungen, im Rahmen dieser Arbeit durch den Vergleich der differentiellen miRNA Regulation in *Dicer*^{lox/lox} und *Dicer*^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} Mäusen unter Baseline Bedingungen sowie sieben Tage post myokardialer I/R, durch funktionelle Prädiktionsanalysen und in Kombination mit einer umfangreichen Literaturanalyse von > 50 publizierten humanen Studien zahlreiche potentiell auch translational relevante thrombozytärer miRNAs sowie deren möglichen funktionellen Bedeutung zu identifizieren.

Dadurch konnten wir einige spezifische miRNAs identifizieren, die in Thrombozyten differentiell in einer Dicer-abhängigen Art und Weise nach myokardialer I/R reguliert waren und an der Organisation der inflammatorischen Antwort, der Entwicklung der Fibrose im infarzierten Myokard als auch der Angiogenese und dem Remodeling der Peri-Infarktzone im Myokard beteiligt sein könnten (Abb.: 38).

So waren beispielsweise miR-27b-3p, miR-222-3p und miR-335-5p signifikant aufreguliert in Thrombozyten von *Dicer*^{lox/lox} Mäusen nach experimentellen Myokardinfarkt und sieben Tagen Reperfusion, während Thrombozyten von *Dicer*^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} Mäusen keine signifikante Regulation dieser miRNAs aufwiesen.

Diskussion

Unabhängige Studien konnten zeigen, dass miR-27b-3p die Neoangiogenese fördert [306, 307], miR-222-3p antiinflammatorische Effekte ausübt [308] und der Entwicklung der myokardialen Fibrose entgegenwirkt [309], während miR-335-5p das Ausmaß der Inflammation reduziert [310].

Darüber hinaus konnten wir mit miR-92a-3p und miR-21a-3p zwei weitere vielversprechende miRNAs in unserem Krankheitsmodell identifizieren, die für ihre essentielle Rolle in den strukturellen Heilungsprozessen im Herzen nach myokardialer I/R beschrieben worden sind [301]. So konnten wir eine signifikant niedrigere Expression von miR-92a-3p in Thrombozyten von *Dicer*^{lox/lox} Mäusen verglichen zu *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen nach sieben Tagen Reperfusion und myokardialer Ischämie feststellen. Studien haben gezeigt, dass miR-92a-3p ein zentraler Regulator in der Angiogenese darstellt und dass die Inhibition von miR-92a-3p mit Protektion gegenüber myokardialer I/R durch Unterstützung der Neoangiogenese und Unterdrückung negativer Remodeling Prozesse im Herzen assoziiert ist [311-314].

Gleichzeitig wiesen Mäuse mit MK/ thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer ein signifikant erhöhtes Expressionslevel von miR-21a-3p nach experimentellem Myokardinfarkt und Reperfusion auf. Dabei konnten mehrere Studien zeigen, dass sich miR-21a-3p negativ auf die myokardialen Remodeling Prozesse im Herzen durch Modulation der Makrophagen-gesteuerten myokardialen Inflammation, Beeinträchtigung der Neoangiogenese und Stimulation von kardialen Fibroblasten mit verstärkter interstitieller Fibrosierung auswirkt [315-317].

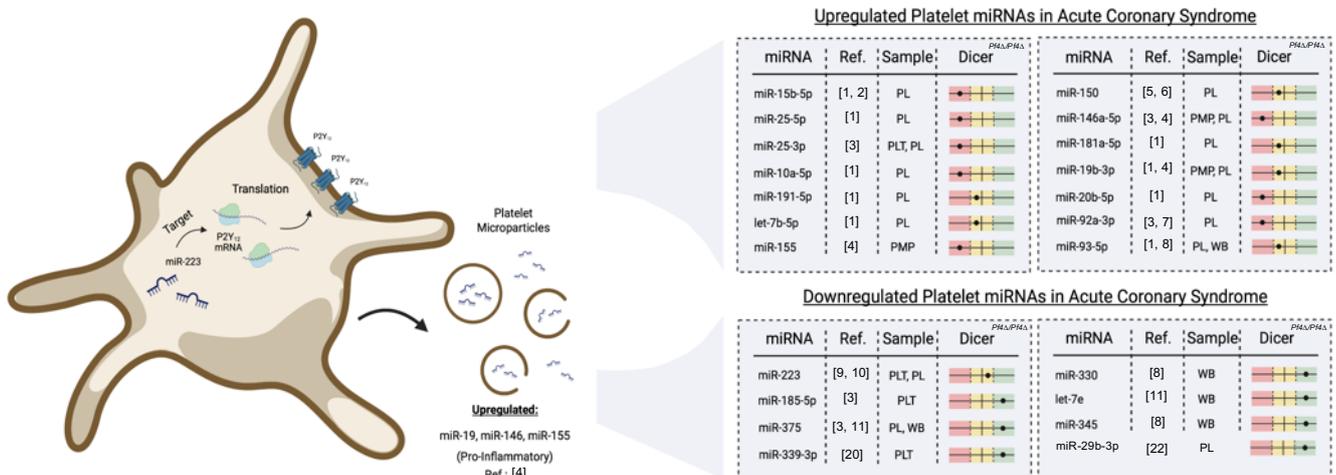


Abbildung 41: Einordnung des translationalen Bezugs unserer Forschungsergebnisse und Vergleich mit der differentiellen miRNA Regulation nach akutem Koronarsyndrom in humanen Patientenstudien

Quelle: *Circ Res.* (2023), Schütte et al.[13]

Links: Mechanistisches Konzept für die Regulation von miR-223 in Thrombozyten, **Rechts:** Zusammenfassung von humanen miRNAs mit übereinstimmender signifikanter Regulation in Reaktion auf das akute Koronarsyndrom wie in unserem tierexperimentellen Modell. Die rechte Spalte gibt die Dicer-abhängig regulierten signifikanten miRNAs aus unseren Versuchen wieder. Rot: Signifikante Aufregulation (FDR<0,05; log₂FC>0,5), Grün: Signifikante Runterregulation (FDR<0,05; log₂FC<-0,5), Gelb: Signifikante aber moderate Auf- oder Runterregulation (FDR<0,05; Auf: 0<log₂FC<0,5; Runter: 0<log₂FC>0,5), Abkürzungen: PL (Plasma), PLT (Plättchen), PMP (Platelet-derived Microparticles), WB (Vollblut). Die Expression wurde mit *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen unter Baseline und/oder 7d post myokardialer I/R Bedingungen verglichen

Zu guter Letzt konnten wir zahlreiche miRNAs identifizieren, die in humanen Studien unter den Bedingungen des akuten Koronarsyndroms in gleicher Art und Weise reguliert waren wie durch die MK/ thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer in unserem experimentellen

Diskussion

Tiermodell (Abb.: 41). Die analysierten humanen miRNA Proben hatten dabei ihren Ursprung in Thrombozyten, Platelet-derived Microparticles, Plasma und Vollblut.

Als eine der häufigsten in Thrombozyten vorkommenden miRNAs stellt miR-223 auch eine der am besten in ihrer Funktion charakterisierten miRNAs in Blutplättchen dar, die in unserer translationalen Gegenüberstellung in vergleichbarer Art und Weise im Menschen als auch im Tiermodell reguliert waren. MiR-223 unterdrückt die Translation des P2Y₁₂ ADP-Rezeptors in Thrombozyten und steuert damit maßgeblich die Plättchenaktivierung [10]. Randomisierte kontrollierte Studien konnten zeigen, dass reduzierte Level von miR-223 ein unabhängiger Prädiktor für eine signifikant verschlechterte Wirkung von antithrombozytäre Therapien darstellten und mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkte einhergingen [9, 318]. Zwar war der Unterschied der differentiellen Regulation von miR-223 zwischen *Dicer*^{lox/lox} und *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen nur moderat, dennoch konnten wir zeigen, dass zumindest unter Baseline Bedingungen miR-223 *Dicer*^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen signifikant herunterreguliert war und somit zu dem in unseren Versuchen beobachteten hyperresponsiven Plättchenphänotypen von *Dicer*-defizienten Thrombozyten beigetragen haben könnte.

Diese Ergebnisse demonstrieren eindrücklich, dass wir mit unseren Versuchen eine potentiell sehr wertvolle Datengrundlage für die Erforschung und präzisen Charakterisierung der vielfältigen Funktionen thrombozytärer miRNAs in den Prozessen der myokardialen I/R geschaffen haben. Es liegt nun an weiterführenden Studien, auf dieser Grundlage aufzubauen und in zusätzlichen Versuchsansätzen die tiefergehende Funktion einzelner thrombozytärer miRNAs zu charakterisieren.

5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren erstmals die Bedeutung thrombozytärer miRNAs und die biologische Relevanz einer funktionellen Dicer-abhängigen miRNA Biogenese in Thrombozyten für die myokardiale Inflammation und die strukturellen Umbauprozesse im Herzen nach Ischämie und Reperfusion.

Unter Anwendung modernen Next-Generation-Sequencing Methoden konnten wir in bisher nicht demonstrierter Tiefe den Umfang und die Diversität des miRNA Repertoires in murinen Thrombozyten auflösen und darüber hinaus die Auswirkungen der Pf4-Promotor gesteuerten Deletion der Endoribonuklease Dicer auf das miRNA Expressionsprofil sowie den reaktiven Phänotypen von Thrombozyten *in vitro* und *in vivo* charakterisieren.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die MK/ thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer durch die Veränderung des miRNA Expressionsprofils in Plättchen einen hyperreagiblen thrombozytären Phänotypen mit verstärkter Adhäsion und Thrombusformation induziert, der nach experimenteller myokardialer Ischämie und Reperfusion im chronischen Langzeitverlauf zu einer signifikant vergrößerten Infarktfläche, verstärkten pro-inflammatorischen Ly6C^{high} geprägten Monozyten/ Makrophagen-Rekrutierung in das reperfundierte Myokard und kompromittierten Angiogenese in der Peri-Infarktzone führt, die sich schließlich in ihrer Gesamtheit über eine vermehrte interstitielle Fibrose und einem negativen myokardialen Remodeling negativ auf funktionellen Heilungsverlauf im Herzen auswirken.

Darüber hinaus konnten wir die Reversibilität dieser *in vivo* beobachteten funktionellen Auswirkungen der Dicer-Deletion unter Therapie mit dem reversiblen P2Y₁₂ ADP-Rezeptor-Antagonisten Ticagrelor demonstrieren.

Wir haben mehrere Mechanismen dargestellt, die zeigen, dass die beobachteten krankheitsrelevanten Unterschiede in unserer Studie gleichermaßen zurückführbar sind auf den demonstrierten Einfluss des veränderten miRNA Expressionsprofils auf die Plättchenphysiologie selbst als auch auf die Folgen einer dysregulierten zellulären Interaktion zwischen Thrombozyten und inflammatorischen Zellen in den präzise aufeinander abgestimmten Prozessen des myokardialen Remodelings.

Zusätzlich konnten wir zahlreiche auch potentiell translational relevante thrombozytäre miRNAs für die Heilungsprozesse im Herzen nach myokardialer Ischämie und Reperfusion identifizieren. Unsere Arbeit stellt damit eine möglicherweise wichtige Grundlage für die Charakterisierung der vielfältigen funktionellen Implikationen thrombozytärer miRNAs und einem besseren Verständnis der vielschichtigen regulativen Ebenen und komplexen heterozellulären Natur kardiovaskulärer Krankheitsprozesse dar.

Es wird nun weitere Forschungsbemühungen brauchen, um auf den im Rahmen dieser Arbeit geschaffenen Grundlagen die regulativen Funktionen einzelner thrombozytärer miRNAs zu entschlüsseln.

6 Literaturverzeichnis

1. Becker, K.C., et al., *Circulating MicroRNA Profiling in Non-ST Elevated Coronary Artery Syndrome Highlights Genomic Associations with Serial Platelet Reactivity Measurements*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 6169.
2. Tijssen, A.J., et al., *MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure*. Circ Res, 2010. **106**(6): p. 1035-9.
3. Ward, J.A., et al., *Circulating Cell and Plasma microRNA Profiles Differ between Non-ST-Segment and ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction*. Fam Med Med Sci Res, 2013. **2**(2): p. 108.
4. Diehl, P., et al., *Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation*. Cardiovasc Res, 2012. **93**(4): p. 633-44.
5. Willeit, P., et al., *Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation*. Circ Res, 2013. **112**(4): p. 595-600.
6. Zeller, T., et al., *Assessment of microRNAs in patients with unstable angina pectoris*. Eur Heart J, 2014. **35**(31): p. 2106-14.
7. De Rosa, S., et al., *Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs*. Circulation, 2011. **124**(18): p. 1936-44.
8. Meder, B., et al., *MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2011. **106**(1): p. 13-23.
9. Zampetaki, A., et al., *Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(4): p. 290-9.
10. Landry, P., et al., *Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(9): p. 961-6.
11. D'Alessandra, Y., et al., *Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2010. **31**(22): p. 2765-73.
12. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(18): p. 2231-2264.
13. Schutte, J.P., et al., *Platelet-Derived MicroRNAs Regulate Cardiac Remodeling After Myocardial Ischemia*. Circ Res, 2023. **132**(7): p. e96-e113.
14. Viola, M., S.C.A. de Jager, and J.P.G. Sluijter, *Targeting Inflammation after Myocardial Infarction: A Therapeutic Opportunity for Extracellular Vesicles?* Int J Mol Sci, 2021. **22**(15).
15. Hausenloy, D.J., et al., *The coronary circulation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury: a target for cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2019. **115**(7): p. 1143-1155.
16. Jonas, S. and E. Izaurralde, *Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing*. Nat Rev Genet, 2015. **16**(7): p. 421-33.
17. Kim, V.N., *MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 376-85.
18. McManus, D.D. and J.E. Freedman, *MicroRNAs in platelet function and cardiovascular disease*. Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(12): p. 711-7.
19. Nahrendorf, M., M.J. Pittet, and F.K. Swirski, *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction*. Circulation, 2010. **121**(22): p. 2437-45.
20. Osman, A. and K. Falker, *Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes*. Platelets, 2011. **22**(6): p. 433-41.
21. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
22. Corsten, M.F., et al., *Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease*. Circ Cardiovasc Genet, 2010. **3**(6): p. 499-506.

Literaturverzeichnis

23. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
24. WHO, *World health statistics 2021: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals*. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2021.
25. Theo Vos, S.S.L., Cristiana Abbafati, Kaja M Abbas, Mohammad Abbasi, Collaborators, *Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019*. The Lancet, 2020.
26. Writing Group, M., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2016. **133**(4): p. e38-360.
27. *Deutscher Herzbericht 2020* ed. M.H. Eckart Fleck, Thomas Meinertz, Kurt Bestehorn, Ariane Pott, Mirja Rohjans. 2020, Frankfurt am Main: Deutsche Herzstiftung e.V. Bockenheimer Landstr. 94-96, Georg Thieme Verlag KG.
28. (Destatis), S.B., *Pressemitteilung Nr. 316, Krankheitskosten 2020 nach ausgewählten Krankheitskapiteln und Geschlecht*. 2022.
29. Joseph, P., et al., *Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors*. Circ Res, 2017. **121**(6): p. 677-694.
30. Dai, H., et al., *Global, regional, and national burden of ischaemic heart disease and its attributable risk factors, 1990-2017: results from the Global Burden of Disease Study 2017*. Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes, 2022. **8**(1): p. 50-60.
31. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
32. Ibanez, B., et al., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2018. **39**(2): p. 119-177.
33. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
34. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J, 2016. **37**(27): p. 2129-2200.
35. Anderson, J.L. and D.A. Morrow, *Acute Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2017. **376**(21): p. 2053-2064.
36. Boren, J., et al., *Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel*. Eur Heart J, 2020. **41**(24): p. 2313-2330.
37. Libby, P., et al., *Atherosclerosis*. Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 56.
38. Bennett, M.R., S. Sinha, and G.K. Owens, *Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 692-702.
39. Geng, Y.J. and P. Libby, *Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme*. Am J Pathol, 1995. **147**(2): p. 251-66.
40. Libby, P., *Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy*. N Engl J Med, 2013. **368**(21): p. 2004-13.
41. Bentzon, J.F., et al., *Mechanisms of plaque formation and rupture*. Circ Res, 2014. **114**(12): p. 1852-66.
42. Libby, P., *The changing landscape of atherosclerosis*. Nature, 2021. **592**(7855): p. 524-533.
43. Arora, S., et al., *Twenty Year Trends and Sex Differences in Young Adults Hospitalized With Acute Myocardial Infarction*. Circulation, 2019. **139**(8): p. 1047-1056.

Literaturverzeichnis

44. Towfighi, A., D. Markovic, and B. Ovbiagele, *National gender-specific trends in myocardial infarction hospitalization rates among patients aged 35 to 64 years*. Am J Cardiol, 2011. **108**(8): p. 1102-7.
45. Gupta, S., et al., *Type 2 versus type 1 myocardial infarction: a comparison of clinical characteristics and outcomes with a meta-analysis of observational studies*. Cardiovasc Diagn Ther, 2017. **7**(4): p. 348-358.
46. Stone, G.W., et al., *A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis*. N Engl J Med, 2011. **364**(3): p. 226-35.
47. Schoenhagen, P., et al., *Coronary plaque morphology and frequency of ulceration distant from culprit lesions in patients with unstable and stable presentation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(10): p. 1895-900.
48. Arbab-Zadeh, A., et al., *Acute coronary events*. Circulation, 2012. **125**(9): p. 1147-56.
49. Glagov, S., et al., *Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries*. N Engl J Med, 1987. **316**(22): p. 1371-5.
50. Pasterkamp, G., H.M. den Ruijter, and P. Libby, *Temporal shifts in clinical presentation and underlying mechanisms of atherosclerotic disease*. Nat Rev Cardiol, 2017. **14**(1): p. 21-29.
51. Quillard, T., et al., *Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques*. Curr Opin Lipidol, 2017. **28**(5): p. 434-441.
52. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
53. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. Circ Res, 2012. **110**(1): p. 159-73.
54. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1391-401.
55. Timmers, L., et al., *The innate immune response in reperfused myocardium*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(2): p. 276-83.
56. Arslan, F., D.P. de Kleijn, and G. Pasterkamp, *Innate immune signaling in cardiac ischemia*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(5): p. 292-300.
57. de Haan, J.J., et al., *Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 206039.
58. Mann, D.L., *The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls*. Circ Res, 2011. **108**(9): p. 1133-45.
59. Newton, K. and V.M. Dixit, *Signaling in innate immunity and inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(3).
60. Kobayashi, Y., *Neutrophil infiltration and chemokines*. Crit Rev Immunol, 2006. **26**(4): p. 307-16.
61. Kukielka, G.L., et al., *Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1504-16.
62. Gwechenberger, M., et al., *Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions*. Circulation, 1999. **99**(4): p. 546-51.
63. Tarzami, S.T., et al., *Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 dependent MCP-1 expression protects cardiomyocytes from cell death*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(2): p. 209-21.
64. Pinto, A.R., et al., *Revisiting Cardiac Cellular Composition*. Circ Res, 2016. **118**(3): p. 400-9.
65. Yan, X., et al., *Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **62**: p. 24-35.
66. Vandervelde, S., et al., *Increased inflammatory response and neovascularization in reperfused vs. non-reperfused murine myocardial infarction*. Cardiovasc Pathol, 2006. **15**(2): p. 83-90.
67. Detmers, P.A., et al., *Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils*. J Exp Med, 1990. **171**(4): p. 1155-62.

Literaturverzeichnis

68. Herter, J. and A. Zarbock, *Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment*. J Immunol, 2013. **190**(9): p. 4451-7.
69. Swirski, F.K., et al., *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. Science, 2009. **325**(5940): p. 612-6.
70. Dewald, O., et al., *CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts*. Circ Res, 2005. **96**(8): p. 881-9.
71. Peet, C., et al., *Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2020. **116**(6): p. 1101-1112.
72. Heidt, T., et al., *Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction*. Circ Res, 2014. **115**(2): p. 284-95.
73. Saxena, A., et al., *IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium*. J Immunol, 2013. **191**(9): p. 4838-48.
74. Rienks, M., et al., *Myocardial extracellular matrix: an ever-changing and diverse entity*. Circ Res, 2014. **114**(5): p. 872-88.
75. Horckmans, M., et al., *Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype*. Eur Heart J, 2017. **38**(3): p. 187-197.
76. Nahrendorf, M. and F.K. Swirski, *Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function*. Circ Res, 2016. **119**(3): p. 414-7.
77. Hilgendorf, I., et al., *Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium*. Circ Res, 2014. **114**(10): p. 1611-22.
78. Anzai, A., et al., *Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling*. Circulation, 2012. **125**(10): p. 1234-45.
79. Hofmann, U., et al., *Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice*. Circulation, 2012. **125**(13): p. 1652-63.
80. Zymek, P., et al., *The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(11): p. 2315-23.
81. Kanisicak, O., et al., *Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12260.
82. Dobaczewski, M., et al., *Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts*. Cell Tissue Res, 2006. **324**(3): p. 475-88.
83. Bujak, M., et al., *Induction of the CXC chemokine interferon-gamma-inducible protein 10 regulates the reparative response following myocardial infarction*. Circ Res, 2009. **105**(10): p. 973-83.
84. Heusch, G., et al., *Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure*. Lancet, 2014. **383**(9932): p. 1933-43.
85. Heusch, G., *Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective*. Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(12): p. 773-789.
86. Keeley, E.C., J.A. Boura, and C.L. Grines, *Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials*. Lancet, 2003. **361**(9351): p. 13-20.
87. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction*. Circulation, 1982. **66**(6): p. 1146-9.
88. Duncker, D.J., et al., *"Myocardial stunning" remaining questions*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(3): p. 549-58.
89. Krug, A., R. Du Mesnil de, and G. Korb, *Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion*. Circ Res, 1966. **19**(1): p. 57-62.
90. Ito, H., *No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. **3**(9): p. 499-506.
91. Kaul, S., *The "no reflow" phenomenon following acute myocardial infarction: mechanisms and treatment options*. J Cardiol, 2014. **64**(2): p. 77-85.
92. Manning, A.S. and D.J. Hearse, *Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention*. J Mol Cell Cardiol, 1984. **16**(6): p. 497-518.

Literaturverzeichnis

93. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 1998. **38**(2): p. 291-300.
94. Zweier, J.L., *Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(3): p. 1353-7.
95. Zweier, J.L. and M.A. Talukder, *The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2006. **70**(2): p. 181-90.
96. Smart, S.C., et al., *Injury to the Ca²⁺ ATPase of the sarcoplasmic reticulum in anesthetized dogs contributes to myocardial reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 1997. **36**(2): p. 174-84.
97. Tavazzi, B., et al., *Lipid peroxidation, tissue necrosis, and metabolic and mechanical recovery of isolated reperfused rat heart as a function of increasing ischemia*. *Free Radic Res*, 1998. **28**(1): p. 25-37.
98. Siegmund, B., Y.V. Ladilov, and H.M. Piper, *Importance of sodium for recovery of calcium control in reoxygenated cardiomyocytes*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(2 Pt 2): p. H506-13.
99. Ruiz-Meana, M., et al., *Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition*. *Cardiovasc Res*, 1995. **30**(1): p. 64-9.
100. Heusch, G., *The Coronary Circulation as a Target of Cardioprotection*. *Circ Res*, 2016. **118**(10): p. 1643-58.
101. Niccoli, G., et al., *Coronary microvascular obstruction in acute myocardial infarction*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(13): p. 1024-33.
102. Niccoli, G., et al., *Myocardial no-reflow in humans*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(4): p. 281-92.
103. Niccoli, G., et al., *No-reflow: again prevention is better than treatment*. *Eur Heart J*, 2010. **31**(20): p. 2449-55.
104. Dorge, H., et al., *Perfusion-contraction mismatch with coronary microvascular obstruction: role of inflammation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **279**(6): p. H2587-92.
105. Thielmann, M., et al., *Myocardial dysfunction with coronary microembolization: signal transduction through a sequence of nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, and sphingosine*. *Circ Res*, 2002. **90**(7): p. 807-13.
106. Herrmann, J., et al., *Abnormal coronary flow velocity reserve after coronary intervention is associated with cardiac marker elevation*. *Circulation*, 2001. **103**(19): p. 2339-45.
107. Kleinbongard, P., et al., *Vasoconstrictor potential of coronary aspirate from patients undergoing stenting of saphenous vein aortocoronary bypass grafts and its pharmacological attenuation*. *Circ Res*, 2011. **108**(3): p. 344-52.
108. Stempien-Otero, A., et al., *Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(12): p. 8039-45.
109. Maxwell, L. and J.B. Gavin, *The role of post-ischaemic reperfusion in the development of microvascular incompetence and ultrastructural damage in the myocardium*. *Basic Res Cardiol*, 1991. **86**(6): p. 544-53.
110. Liu, Y., et al., *TXNIP mediates NLRP3 inflammasome activation in cardiac microvascular endothelial cells as a novel mechanism in myocardial ischemia/reperfusion injury*. *Basic Res Cardiol*, 2014. **109**(5): p. 415.
111. Kasseckert, S.A., et al., *Stimulation of cGMP signalling protects coronary endothelium against reperfusion-induced intercellular gap formation*. *Cardiovasc Res*, 2009. **83**(2): p. 381-7.
112. Wu, K.C., et al., *Prognostic significance of microvascular obstruction by magnetic resonance imaging in patients with acute myocardial infarction*. *Circulation*, 1998. **97**(8): p. 765-72.
113. Weis, S., et al., *Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(6): p. 885-94.

Literaturverzeichnis

114. Weis, S., et al., *Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis*. J Cell Biol, 2004. **167**(2): p. 223-9.
115. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 497-504.
116. Scotland, R.S., et al., *C-type natriuretic peptide inhibits leukocyte recruitment and platelet-leukocyte interactions via suppression of P-selectin expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(40): p. 14452-7.
117. van den Berg, B.M., H. Vink, and J.A. Spaan, *The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema*. Circ Res, 2003. **92**(6): p. 592-4.
118. Chappell, D., et al., *Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion*. Shock, 2010. **34**(2): p. 133-9.
119. Chappell, D., et al., *Protection of glycocalyx decreases platelet adhesion after ischaemia/reperfusion: an animal study*. Eur J Anaesthesiol, 2014. **31**(9): p. 474-81.
120. Galaup, A., et al., *Protection against myocardial infarction and no-reflow through preservation of vascular integrity by angiopoietin-like 4*. Circulation, 2012. **125**(1): p. 140-9.
121. Mollenhauer, M., et al., *Myeloperoxidase Mediates Postischemic Arrhythmogenic Ventricular Remodeling*. Circ Res, 2017. **121**(1): p. 56-70.
122. Bitencourt, C.S., et al., *Cooperative role of endogenous leucotrienes and platelet-activating factor in ischaemia-reperfusion-mediated tissue injury*. J Cell Mol Med, 2013. **17**(12): p. 1554-65.
123. Coller, B.S., *Bizzozzero and the discovery of the blood platelet*. Lancet, 1984. **1**(8380): p. 804.
124. von Hundelshausen, P. and C. Weber, *Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease*. Circ Res, 2007. **100**(1): p. 27-40.
125. Gawaz, M. and S. Vogel, *Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells*. Blood, 2013. **122**(15): p. 2550-4.
126. Walsh, T.G., P. Metharom, and M.C. Berndt, *The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis*. Platelets, 2015. **26**(3): p. 199-211.
127. Lazar, S. and L.E. Goldfinger, *Platelets and extracellular vesicles and their cross talk with cancer*. Blood, 2021. **137**(23): p. 3192-3200.
128. Ziegler, M., et al., *Highly Sensitive Detection of Minimal Cardiac Ischemia using Positron Emission Tomography Imaging of Activated Platelets*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38161.
129. Liu, Y., et al., *Novel role of platelets in mediating inflammatory responses and ventricular rupture or remodeling following myocardial infarction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(4): p. 834-41.
130. Walsh, T.G. and A.W. Poole, *Do platelets promote cardiac recovery after myocardial infarction: roles beyond occlusive ischemic damage*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018. **314**(5): p. H1043-H1048.
131. Ziegler, M., X. Wang, and K. Peter, *Platelets in cardiac ischaemia/reperfusion injury: a promising therapeutic target*. Cardiovasc Res, 2019. **115**(7): p. 1178-1188.
132. Coppinger, J.A., et al., *Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2096-104.
133. Stellos, K., et al., *Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells*. Circulation, 2008. **117**(2): p. 206-15.
134. Gutmann, C., A. Joshi, and M. Mayr, *Platelet "-omics" in health and cardiovascular disease*. Atherosclerosis, 2020. **307**: p. 87-96.
135. Peng, B., et al., *Identification of key lipids critical for platelet activation by comprehensive analysis of the platelet lipidome*. Blood, 2018. **132**(5): p. e1-e12.
136. Manke, M.C., R. Ahrends, and O. Borst, *Platelet lipid metabolism in vascular thrombo-inflammation*. Pharmacol Ther, 2022. **237**: p. 108258.

Literaturverzeichnis

137. Risitano, A., et al., *Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer*. Blood, 2012. **119**(26): p. 6288-95.
138. Duerschmied, D., et al., *Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice*. Blood, 2013. **121**(6): p. 1008-15.
139. Schober, A., et al., *Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury*. Circulation, 2002. **106**(12): p. 1523-9.
140. Schuhmann, M.K., et al., *Blocking of platelet glycoprotein receptor 1b reduces "thrombo-inflammation" in mice with acute ischemic stroke*. J Neuroinflammation, 2017. **14**(1): p. 18.
141. Gao, X.M., et al., *Mouse model of post-infarct ventricular rupture: time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(2): p. 469-77.
142. Ganame, J., et al., *Impact of myocardial haemorrhage on left ventricular function and remodelling in patients with reperfused acute myocardial infarction*. Eur Heart J, 2009. **30**(12): p. 1440-9.
143. Gaertner, F., et al., *Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria*. Cell, 2017. **171**(6): p. 1368-1382 e23.
144. Huo, Y., et al., *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E*. Nat Med, 2003. **9**(1): p. 61-7.
145. Kohler, D., et al., *Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein prevents platelet-neutrophil complex formation and dampens myocardial ischemia-reperfusion injury*. Circulation, 2011. **123**(22): p. 2579-90.
146. Devanathan, V., et al., *Platelet Gi protein Galphai2 is an essential mediator of thrombo-inflammatory organ damage in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(20): p. 6491-6.
147. Etulain, J., et al., *P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice*. Blood, 2015. **126**(2): p. 242-6.
148. Martinod, K. and D.D. Wagner, *Thrombosis: tangled up in NETs*. Blood, 2014. **123**(18): p. 2768-76.
149. Hashemi, P., et al., *NETosis in ischemic/reperfusion injuries: An organ-based review*. Life Sci, 2022. **290**: p. 120158.
150. Carestia, A., et al., *Platelets Promote Macrophage Polarization toward Pro-inflammatory Phenotype and Increase Survival of Septic Mice*. Cell Rep, 2019. **28**(4): p. 896-908 e5.
151. Uchiyama, R., et al., *Effect of Platelet-Rich Plasma on M1/M2 Macrophage Polarization*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(5).
152. Serhan, C.N. and K.A. Sheppard, *Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro*. J Clin Invest, 1990. **85**(3): p. 772-80.
153. Abdulnour, R.E., et al., *Maresin 1 biosynthesis during platelet-neutrophil interactions is organ-protective*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(46): p. 16526-31.
154. Vital, S.A., et al., *Formyl-Peptide Receptor 2/3/Lipoxin A4 Receptor Regulates Neutrophil-Platelet Aggregation and Attenuates Cerebral Inflammation: Impact for Therapy in Cardiovascular Disease*. Circulation, 2016. **133**(22): p. 2169-79.
155. Lannan, K.L., et al., *Maresin 1 induces a novel pro-resolving phenotype in human platelets*. J Thromb Haemost, 2017. **15**(4): p. 802-813.
156. Corken, A., et al., *Platelet glycoprotein 1b-IX as a regulator of systemic inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(5): p. 996-1001.
157. Xiang, B., et al., *Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2657.
158. Chen, D., et al., *Crosstalk between SDF-1/CXCR4 and SDF-1/CXCR7 in cardiac stem cell migration*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16813.
159. Travers, J.G., et al., *Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens*. Circ Res, 2016. **118**(6): p. 1021-40.

Literaturverzeichnis

160. Bhatt, A.S., A.P. Ambrosy, and E.J. Velazquez, *Adverse Remodeling and Reverse Remodeling After Myocardial Infarction*. *Curr Cardiol Rep*, 2017. **19**(8): p. 71.
161. Pierce, G.F., et al., *Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms*. *J Cell Biol*, 1989. **109**(1): p. 429-40.
162. Yabanoglu, S., et al., *Platelet derived serotonin drives the activation of rat cardiac fibroblasts by 5-HT_{2A} receptors*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**(4): p. 518-25.
163. Meyer, A., et al., *Platelet TGF-beta1 contributions to plasma TGF-beta1, cardiac fibrosis, and systolic dysfunction in a mouse model of pressure overload*. *Blood*, 2012. **119**(4): p. 1064-74.
164. Frangogiannis, N.G., et al., *Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts*. *Circulation*, 2005. **111**(22): p. 2935-42.
165. Xia, Y., et al., *Endogenous thrombospondin 1 protects the pressure-overloaded myocardium by modulating fibroblast phenotype and matrix metabolism*. *Hypertension*, 2011. **58**(5): p. 902-11.
166. de Jong, J.S. and L.R. Dekker, *Platelets and cardiac arrhythmia*. *Front Physiol*, 2010. **1**: p. 166.
167. Pachel, C., et al., *Inhibition of Platelet GPVI Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(4): p. 629-35.
168. Dhanjal, T.S., et al., *Trapped platelets activated in ischemia initiate ventricular fibrillation*. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2013. **6**(5): p. 995-1001.
169. Koltai, M., et al., *Effect of BN 50739, a new platelet activating factor antagonist, on ischaemia induced ventricular arrhythmias in isolated working rat hearts*. *Cardiovasc Res*, 1991. **25**(5): p. 391-7.
170. Yang, B.C., A. Mehta, and J.L. Mehta, *Cardioprotective effects of platelets against ischaemia-reperfusion injury are related in part to platelet glutathione redox cycle*. *Cardiovasc Res*, 1994. **28**(10): p. 1586-93.
171. Yang, B.C. and J.L. Mehta, *Platelet-derived adenosine contributes to the cardioprotective effects of platelets against ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1994. **24**(5): p. 779-85.
172. Yang, B.C., et al., *Platelets protect against myocardial dysfunction and injury induced by ischemia and reperfusion in isolated rat hearts*. *Circ Res*, 1993. **72**(6): p. 1181-90.
173. Walsh, T.G. and A.W. Poole, *Platelets Protect Cardiomyocytes from Ischaemic Damage*. *TH Open*, 2017. **1**(1): p. e24-32.
174. Battinelli, E.M., B.A. Markens, and J.E. Italiano, Jr., *Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis*. *Blood*, 2011. **118**(5): p. 1359-69.
175. Nording, H., et al., *The C5a/C5a receptor 1 axis controls tissue neovascularization through CXCL4 release from platelets*. *Nat Commun*, 2021. **12**(1): p. 3352.
176. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281-97.
177. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. *Cell*, 2009. **136**(2): p. 215-33.
178. Miranda, K.C., et al., *A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes*. *Cell*, 2006. **126**(6): p. 1203-17.
179. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. *Genome Res*, 2009. **19**(1): p. 92-105.
180. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. *Nature*, 2004. **431**(7006): p. 350-5.
181. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. *Science*, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
182. Mourelatos, Z., et al., *miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs*. *Genes Dev*, 2002. **16**(6): p. 720-8.
183. Kim, V.N., *MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export*. *Trends Cell Biol*, 2004. **14**(4): p. 156-9.

Literaturverzeichnis

184. Murchison, E.P. and G.J. Hannon, *miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(3): p. 223-9.
185. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. *EMBO J*, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
186. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. *Nature*, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
187. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. *Nature*, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
188. Filipponov, V., et al., *A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes*. *Gene*, 2000. **245**(1): p. 213-21.
189. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. *Genes Dev*, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
190. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
191. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells*. *RNA*, 2003. **9**(1): p. 112-23.
192. Zeng, Y., R. Yi, and B.R. Cullen, *Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha*. *EMBO J*, 2005. **24**(1): p. 138-48.
193. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
194. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
195. Zhang, H., et al., *Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III*. *Cell*, 2004. **118**(1): p. 57-68.
196. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. *Nature*, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
197. Fareh, M., et al., *TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 13694.
198. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. *Science*, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
199. Hammond, S.M., et al., *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*. *Nature*, 2000. **404**(6775): p. 293-6.
200. Ma, E., et al., *Coordinated activities of human dicer domains in regulatory RNA processing*. *J Mol Biol*, 2012. **422**(4): p. 466-76.
201. Kurzynska-Kokorniak, A., et al., *Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 23989.
202. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. *Cell*, 2003. **115**(2): p. 199-208.
203. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. *Cell*, 2003. **115**(2): p. 209-16.
204. Bartel, D.P., *Metazoan MicroRNAs*. *Cell*, 2018. **173**(1): p. 20-51.
205. Ameres, S.L., J. Martinez, and R. Schroeder, *Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC*. *Cell*, 2007. **130**(1): p. 101-12.
206. Haley, B. and P.D. Zamore, *Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(7): p. 599-606.
207. Chiu, Y.L. and T.M. Rana, *siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis*. *RNA*, 2003. **9**(9): p. 1034-48.
208. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. *Science*, 2002. **297**(5589): p. 2056-60.
209. Jones-Rhoades, M.W., D.P. Bartel, and B. Bartel, *MicroRNAs and their regulatory roles in plants*. *Annu Rev Plant Biol*, 2006. **57**: p. 19-53.
210. Grimson, A., et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. *Mol Cell*, 2007. **27**(1): p. 91-105.
211. Guo, H., et al., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. *Nature*, 2010. **466**(7308): p. 835-40.

Literaturverzeichnis

212. Eichhorn, S.W., et al., *mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues*. Mol Cell, 2014. **56**(1): p. 104-15.
213. Huntzinger, E. and E. Izaurralde, *Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(2): p. 99-110.
214. Fabian, M.R. and N. Sonenberg, *The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(6): p. 586-93.
215. Liu, J., et al., *A role for the P-body component GW182 in microRNA function*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(12): p. 1261-6.
216. Chen, C.Y. and A.B. Shyu, *Mechanisms of deadenylation-dependent decay*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011. **2**(2): p. 167-83.
217. Mathonnet, G., et al., *MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1764-7.
218. Kedersha, N., et al., *Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling*. J Cell Biol, 2005. **169**(6): p. 871-84.
219. Bhattacharyya, S.N., et al., *Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1111-24.
220. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1931-4.
221. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
222. Stavast, C.J. and S.J. Erkeland, *The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation*. Cells, 2019. **8**(11).
223. Hwang, H.W., E.A. Wentzel, and J.T. Mendell, *A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import*. Science, 2007. **315**(5808): p. 97-100.
224. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.
225. Melchinger, H., et al., *Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone*. Front Cardiovasc Med, 2019. **6**: p. 153.
226. Patel, S.R., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3348-54.
227. Richardson, J.L., et al., *Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4066-75.
228. Ts'ao, C.H., *Rough endoplasmic reticulum and ribosomes in blood platelets*. Scand J Haematol, 1971. **8**(2): p. 134-40.
229. Kieffer, N., et al., *Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets*. Eur J Biochem, 1987. **164**(1): p. 189-95.
230. Booyse, F.M. and M.E. Rafelson, Jr., *Studies on human platelets. I. synthesis of platelet protein in a cell-free system*. Biochim Biophys Acta, 1968. **166**(3): p. 689-97.
231. Warshaw, A.L., L. Laster, and N.R. Shulman, *Protein synthesis by human platelets*. J Biol Chem, 1967. **242**(9): p. 2094-7.
232. Roth, G.J., et al., *Circulating human blood platelets retain appreciable amounts of poly (A)+ RNA*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **160**(2): p. 705-10.
233. Weyrich, A.S., et al., *Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5556-61.
234. Evangelista, V., et al., *De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin*. Circ Res, 2006. **98**(5): p. 593-5.
235. Dittrich, M., et al., *Understanding platelets. Lessons from proteomics, genomics and promises from network analysis*. Thromb Haemost, 2005. **94**(5): p. 916-25.
236. Weyrich, A.S., et al., *Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(2): p. 241-6.
237. Denis, M.M., et al., *Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets*. Cell, 2005. **122**(3): p. 379-91.
238. Bugert, P., et al., *Messenger RNA profiling of human platelets by microarray hybridization*. Thromb Haemost, 2003. **90**(4): p. 738-48.

Literaturverzeichnis

239. Gnatenko, D.V., et al., *Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2285-93.
240. McRedmond, J.P., et al., *Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(2): p. 133-44.
241. Dittrich, M., et al., *Analysis of SAGE data in human platelets: features of the transcriptome in an anucleate cell*. Thromb Haemost, 2006. **95**(4): p. 643-51.
242. Lai, E.C., *Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 363-4.
243. Provost, P., Michelson, Alan D., *PLATELETS*. Third ed. Platelet microRNAs. 2013, 525 B Street, Suite 1800, San Diego, CA 92101-4495, USA: Academic Press, Elsevier Inc., ISBN: 978-0-12-387837-3.
244. Bruchova, H., M. Merkerova, and J.T. Prchal, *Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera*. Haematologica, 2008. **93**(7): p. 1009-16.
245. Merkerova, M., M. Belickova, and H. Bruchova, *Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages*. Eur J Haematol, 2008. **81**(4): p. 304-10.
246. Kannan, M., et al., *Membrane array-based differential profiling of platelets during storage for 52 miRNAs associated with apoptosis*. Transfusion, 2009. **49**(7): p. 1443-50.
247. Ple, H., et al., *The repertoire and features of human platelet microRNAs*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50746.
248. Garzon, R., et al., *MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 5078-83.
249. Opalinska, J.B., et al., *MicroRNA expression in maturing murine megakaryocytes*. Blood, 2010. **116**(23): p. e128-38.
250. Hutvagner, G. and M.J. Simard, *Argonaute proteins: key players in RNA silencing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 22-32.
251. Heijnen, H.F., et al., *Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3791-9.
252. Nieuwland, R., et al., *Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis*. Blood, 2000. **95**(3): p. 930-5.
253. Merten, M., et al., *Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism*. Circulation, 1999. **99**(19): p. 2577-82.
254. Forlow, S.B., R.P. McEver, and M.U. Nollert, *Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow*. Blood, 2000. **95**(4): p. 1317-23.
255. Zeng, Z., et al., *Platelet-derived miR-223 promotes a phenotypic switch in arterial injury repair*. J Clin Invest, 2019. **129**(3): p. 1372-1386.
256. Gidlof, O., et al., *Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression*. Blood, 2013. **121**(19): p. 3908-17, S1-26.
257. Ambrose, A.R., et al., *Comparison of the release of microRNAs and extracellular vesicles from platelets in response to different agonists*. Platelets, 2018. **29**(5): p. 446-454.
258. Laffont, B., et al., *Platelet microparticles reprogram macrophage gene expression and function*. Thromb Haemost, 2016. **115**(2): p. 311-23.
259. Semple, J.W., *Platelets deliver small packages of genetic function*. Blood, 2013. **122**(2): p. 155-6.
260. Edelstein, L.C., *The role of platelet microvesicles in intercellular communication*. Platelets, 2017. **28**(3): p. 222-227.
261. Mussbacher, M., et al., *Horizontal MicroRNA Transfer by Platelets - Evidence and Implications*. Front Physiol, 2021. **12**: p. 678362.
262. Aatonen, M., M. Gronholm, and P.R. Siljander, *Platelet-derived microvesicles: multitasking participants in intercellular communication*. Semin Thromb Hemost, 2012. **38**(1): p. 102-13.

Literaturverzeichnis

263. Schroit, A.J. and R.F. Zwaal, *Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1071**(3): p. 313-29.
264. Bevers, E.M., et al., *Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1439**(3): p. 317-30.
265. Bevers, E.M., P. Comfurius, and R.F. Zwaal, *Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation*. Biochim Biophys Acta, 1983. **736**(1): p. 57-66.
266. Flaumenhaft, R., et al., *Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles*. Blood, 2009. **113**(5): p. 1112-21.
267. van der Zee, P.M., et al., *P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction*. Clin Chem, 2006. **52**(4): p. 657-64.
268. Frantz, S., et al., *Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: pathophysiology, imaging, and novel therapies*. Eur Heart J, 2022. **43**(27): p. 2549-2561.
269. Gu, Z., et al., *circlize Implements and enhances circular visualization in R*. Bioinformatics, 2014. **30**(19): p. 2811-2.
270. Dweep, H. and N. Gretz, *miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions*. Nat Methods, 2015. **12**(8): p. 697.
271. Cobb, B.S., et al., *T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer*. J Exp Med, 2005. **201**(9): p. 1367-73.
272. Teng, R. and K. Butler, *Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of single ascending doses of ticagrelor, a reversibly binding oral P2Y(12) receptor antagonist, in healthy subjects*. Eur J Clin Pharmacol, 2010. **66**(5): p. 487-96.
273. Bauer, M., et al., *Echocardiographic speckle-tracking based strain imaging for rapid cardiovascular phenotyping in mice*. Circ Res, 2011. **108**(8): p. 908-16.
274. Sengupta, P.P., et al., *Twist mechanics of the left ventricle: principles and application*. JACC Cardiovasc Imaging, 2008. **1**(3): p. 366-76.
275. D'Hooge, J., et al., *Regional strain and strain rate measurements by cardiac ultrasound: principles, implementation and limitations*. Eur J Echocardiogr, 2000. **1**(3): p. 154-70.
276. Sutherland, G.R., et al., *Strain and strain rate imaging: a new clinical approach to quantifying regional myocardial function*. J Am Soc Echocardiogr, 2004. **17**(7): p. 788-802.
277. Sinusas, A.J., et al., *Multimodality cardiovascular molecular imaging, part I*. Circ Cardiovasc Imaging, 2008. **1**(3): p. 244-56.
278. Nahrendorf, M., et al., *Multimodality cardiovascular molecular imaging, Part II*. Circ Cardiovasc Imaging, 2009. **2**(1): p. 56-70.
279. Lee, W.W., et al., *PET/MRI of inflammation in myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(2): p. 153-63.
280. Hamacher, K., H.H. Coenen, and G. Stocklin, *Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution*. J Nucl Med, 1986. **27**(2): p. 235-8.
281. Osborne, M.T. and S. Divakaran, *Seeking clarity: Insights from a highly effective preparation protocol for suppressing myocardial glucose uptake for PET imaging of cardiac inflammation*. J Nucl Cardiol, 2020. **27**(3): p. 862-864.
282. Mochizuki, T., et al., *FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models*. J Nucl Med, 2001. **42**(10): p. 1551-5.
283. Depre, C., J.L. Vanoverschelde, and H. Taegtmeyer, *Glucose for the heart*. Circulation, 1999. **99**(4): p. 578-88.
284. Thackeray, J.T., et al., *Clinically relevant strategies for lowering cardiomyocyte glucose uptake for 18F-FDG imaging of myocardial inflammation in mice*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2015. **42**(5): p. 771-80.
285. Flores, J.E., et al., *The effects of anesthetic agent and carrier gas on blood glucose and tissue uptake in mice undergoing dynamic FDG-PET imaging: sevoflurane and isoflurane compared in air and in oxygen*. Mol Imaging Biol, 2008. **10**(4): p. 192-200.

Literaturverzeichnis

286. Ramos, G.C., et al., *Myocardial aging as a T-cell-mediated phenomenon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(12): p. E2420-E2429.
287. Rieckmann, M., et al., *Myocardial infarction triggers cardioprotective antigen-specific T helper cell responses*. J Clin Invest, 2019. **129**(11): p. 4922-4936.
288. Amich, J., et al., *Three-Dimensional Light Sheet Fluorescence Microscopy of Lungs To Dissect Local Host Immune-Aspergillus fumigatus Interactions*. mBio, 2020. **11**(1).
289. Stegner, D., et al., *Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 127.
290. Horl, D., et al., *BigStitcher: reconstructing high-resolution image datasets of cleared and expanded samples*. Nat Methods, 2019. **16**(9): p. 870-874.
291. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
292. Merz, S.F., et al., *Contemporaneous 3D characterization of acute and chronic myocardial I/R injury and response*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 2312.
293. Lee, D., et al., *Differential dynamics of platelet contact and spreading*. Biophys J, 2012. **102**(3): p. 472-82.
294. Mattila, P.K. and P. Lappalainen, *Filopodia: molecular architecture and cellular functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(6): p. 446-54.
295. Bernstein, E., et al., *Dicer is essential for mouse development*. Nat Genet, 2003. **35**(3): p. 215-7.
296. Cobb, B.S., et al., *A role for Dicer in immune regulation*. J Exp Med, 2006. **203**(11): p. 2519-27.
297. Edelstein, L.C. and P.F. Bray, *MicroRNAs in platelet production and activation*. Blood, 2011. **117**(20): p. 5289-96.
298. Chapnik, E., et al., *miR-142 orchestrates a network of actin cytoskeleton regulators during megakaryopoiesis*. Elife, 2014. **3**: p. e01964.
299. Boilard, E. and C. Belleannée, *(Dicer)phering roles of microRNA in platelets*. Blood, 2016. **127**(14): p. 1733-4.
300. Rowley, J.W., et al., *Dicer1-mediated miRNA processing shapes the mRNA profile and function of murine platelets*. Blood, 2016. **127**(14): p. 1743-51.
301. Small, E.M. and E.N. Olson, *Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 336-42.
302. Wei, Y., et al., *Dicer in Macrophages Prevents Atherosclerosis by Promoting Mitochondrial Oxidative Metabolism*. Circulation, 2018. **138**(18): p. 2007-2020.
303. Elghezawy, A., et al., *Dicer cleavage by calpain determines platelet microRNA levels and function in diabetes*. Circ Res, 2015. **117**(2): p. 157-65.
304. Nagalla, S., et al., *Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity*. Blood, 2011. **117**(19): p. 5189-97.
305. Alimonti, A., et al., *Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility*. Nat Genet, 2010. **42**(5): p. 454-8.
306. Urbich, C., et al., *MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by targeting semaphorin 6A*. Blood, 2012. **119**(6): p. 1607-16.
307. Wang, J.M., et al., *MicroRNA miR-27b rescues bone marrow-derived angiogenic cell function and accelerates wound healing in type 2 diabetes mellitus*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(1): p. 99-109.
308. Sapp, R.M., et al., *Race-specific changes in endothelial inflammation and microRNA in response to an acute inflammatory stimulus*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2021. **320**(6): p. H2371-H2384.
309. Verjans, R., et al., *MicroRNA-221/222 Family Counteracts Myocardial Fibrosis in Pressure Overload-Induced Heart Failure*. Hypertension, 2018. **71**(2): p. 280-288.
310. Gu, X., X. Yao, and D. Liu, *Up-regulation of microRNA-335-5p reduces inflammation via negative regulation of the TPX2-mediated AKT/GSK3beta signaling pathway in a chronic rhinosinusitis mouse model*. Cell Signal, 2020. **70**: p. 109596.
311. Hinkel, R., et al., *Inhibition of microRNA-92a protects against ischemia/reperfusion injury in a large-animal model*. Circulation, 2013. **128**(10): p. 1066-75.

Abbildungsverzeichnis

312. Bonauer, A., et al., *MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice*. Science, 2009. **324**(5935): p. 1710-3.
313. Rogg, E.M., et al., *Analysis of Cell Type-Specific Effects of MicroRNA-92a Provides Novel Insights Into Target Regulation and Mechanism of Action*. Circulation, 2018. **138**(22): p. 2545-2558.
314. Bellera, N., et al., *Single intracoronary injection of encapsulated antagomir-92a promotes angiogenesis and prevents adverse infarct remodeling*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(5): p. e000946.
315. Hinkel, R., et al., *AntimiR-21 Prevents Myocardial Dysfunction in a Pig Model of Ischemia/Reperfusion Injury*. J Am Coll Cardiol, 2020. **75**(15): p. 1788-1800.
316. Ramanujam, D., et al., *MicroRNA-21-Dependent Macrophage-to-Fibroblast Signaling Determines the Cardiac Response to Pressure Overload*. Circulation, 2021. **143**(15): p. 1513-1525.
317. Thum, T., et al., *MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 980-4.
318. Shi, R., et al., *Decreased platelet miR-223 expression is associated with high on-clopidogrel platelet reactivity*. Thromb Res, 2013. **131**(6): p. 508-13.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Myokardinfarkt Typen 1 und 2.....	3
Abbildung 2: Biologische Phasen der myokardialen Heilungsprozesse nach akutem Myokardinfarkt.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der biphasischen monozytären Inflammation nach akutem Myokardinfarkt.....	8
Abbildung 4: Schematische Übersicht der vielfältigen Einflüsse der Reperfusion auf die koronare Zirkulation.....	13
Abbildung 5: Biogenese und Funktion von miRNAs.....	19
Abbildung 6: Struktureller Aufbau von Drosha und Dicer.....	20
Abbildung 7: Prinzip der miRNA-mRNA Interaktion.....	23
Abbildung 8: Mechanismus- miRNA Gen Silencing im Menschen.....	24
Abbildung 9: Existenz eines funktionellen miRNA Repertoires in Thrombozyten.....	28
Abbildung 10: Schematische Darstellung des interzellulären Transfers thrombozytärer miRNAs.....	31
Abbildung 11: Versuchsaufbau Modell Myokardiale I/R.....	39
Abbildung 12: Modell Myokardiale I/R- Operativer Eingriff Übersichtsaufnahmen.....	41
Abbildung 13: Modell Myokardiale I/R- Ligaturtechnik.....	41
Abbildung 14: Evans Blue/ TTC Färbung.....	42
Abbildung 15: Versuchsaufbau Echokardiographie.....	44
Abbildung 16: Strain-Analyse Richtungsvektoren.....	45
Abbildung 17: Strain-Analyse Myokardiale Segmente (PLAX).....	46
Abbildung 18: Versuchsaufbau Kardiales PET/MRT.....	47
Abbildung 19: Aufbau Lichtscheibenfluoreszenzmikroskop (LSFM).....	54
Abbildung 20: Transparente Herzprobe (Murin).....	55
Abbildung 21: Das miRNA Repertoire in murinen Thrombozyten.....	61
Abbildung 22: Thrombozytenspezifische Deletion von Dicer mRNA in der Dicer ^{Pf4Δ/ Pf4Δ} Maus.....	62
Abbildung 23: Einfluss der MK/thrombozyten-spezifischen Deletion von Dicer auf das miRNA Repertoire.....	63
Abbildung 24: Differentiell regulierte thrombozytäre miRNAs durch die MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 25: MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer induziert einen hyperresponsiven Plättchenphänotypen mit verstärkter Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung, Fibrinogenbindung, vermehrtem Spreading und Adhäsion nach Thrombinstimulation	65
Abbildung 26: Studiendesign zur Induktion der experimentellen myokardialen Ischämie/ Reperfusion im Mausmodell	66
Abbildung 27: Einfluss der MK/ thrombozyten-spezifischen Deletion von Dicer auf die Infarktfläche und kardiale Funktion nach myokardialer I/R und einem Tag Reperfusion in der akuten Phase der Inflammation	66
Abbildung 28: MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer führt zu einer signifikant größeren Infarktfläche und reduzierten kardialen Funktion nach myokardialer I/R und sieben Tage Reperfusion in der späten Phase der Inflammation	67
Abbildung 29: Signifikant erhöhte Immunzell-Infiltration im Myokard von Mäusen mit MK/thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion	68
Abbildung 30: <i>Dicer</i> ^{Pf4Δ/Pf4Δ} Thrombozyten weisen eine erhöhte CD62 P-Selektin Expression und eine verstärkte Koaggregation mit CD45 ⁺ -Leukozyten nach myokardialer I/R und 7d Reperfusion auf	69
Abbildung 31: MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer führt zur signifikant verstärkten Akkumulation von Thrombozyten im Bereich des Myokards nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion	70
Abbildung 32: Thrombozytäre miRNAs regulieren die Monozyten-/ Makrophagen-spezifische Inflammation nach experimenteller myokardialer Ischämie und sieben Tagen Reperfusion	71
Abbildung 33: Der Überstand von Thrombin-stimulierten Dicer-defizienten Thrombozyten weist eine signifikant erhöhte migratorische Kapazität auf murine Raw 264.7 Makrophagen in vitro auf	71
Abbildung 34: MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer beeinträchtigt die Angiogenese und erhöht die Ausbildung profibrotischer Myofibroblasten nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion	72
Abbildung 35: Behandlung mit dem reversiblen P2Y ₁₂ Rezeptor-Antagonisten Ticagrelor schützt vor einer vergrößerten Infarktfläche und negativen Remodeling in Mäusen mit MK/ thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer	74
Abbildung 36: MK/thrombozyten-spezifische Deletion von Dicer führt zu einer aggravierten fibrotischen Narbenformation und langfristig reduzierter kardialen Funktion nach myokardialer I/R und 28 Tagen Reperfusion	75
Abbildung 37: Mäuse mit MK/ thrombozyten-spezifischer Deletion von Dicer weisen langfristig ein nachteiliges myokardiales Remodeling nach experimenteller LAC-Ligatur und Reperfusion über 28 Tage auf	76
Abbildung 38: Funktionelle Prädiktionsanalyse von differentiell nach myokardialer I/R und sieben Tagen Reperfusion regulierten thrombozytären miRNAs in <i>Dicer</i> ^{lox/lox} oder <i>Dicer</i> ^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen	77
Abbildung 39: Mengendiagramm zur Analyse der differentiellen miRNA Regulation in Thrombozyten von <i>Dicer</i> ^{lox/lox} oder <i>Dicer</i> ^{Pf4Δ/Pf4Δ} Mäusen	78
Abbildung 40: Schematische Darstellung der Mechanismen und Auswirkungen der MK/ thrombozyten-spezifischen Ablation der Dicer-abhängigen miRNA Biogenese auf das Herz nach myokardialer I/R	80
Abbildung 41: Einordnung des translationalen Bezugs unserer Forschungsergebnisse und Vergleich mit der differentiellen miRNA Regulation nach akutem Koronarsyndrom in humanen Patientenstudien	82

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Klassifikation des akuten Myokardinfarktes 2

9 Abkürzungsverzeichnis

[¹⁸ F]FDG	2-Deoxy-2-[¹⁸ F]-Fluor-D-Glucose	LVEDV	Left Ventricular End-Diastolic Volume
A	Arteria	LVESD	Left Ventricular End-Systolic Diameter
AaR	Area at Risk	M	Musculus
ACD	Acid-Citrate-Dextrose	MBq	Megabecquerel
ACS	Acute Coronary Syndrome	mg	Milligramm
AMI	Akuter Myokardinfarkt	MHz	Megahertz
CO	Cardiac Output	MRT	Magnetresonanztomographie
DAMPs	Danger-associated molecular patterns	OSEM	Ordered Subset Expectation Maximisation
Echo	Echokardiographie	PET	Positronen-Emissions-Tomographie
FS	Fractional Shortening	PLAX	Parasternal Long Axis
FSC	Forward Scatter	PMP	Platelet Microparticle
G	Gauge	PMPs	Platelet Microparticles
I/R	Ischämie/ Reperfusion	PRRs	Pattern-recognition receptors
IU	International Unit	PSAX	Parasternal Short Axis
kgKG	Kilogramm Körpergewicht	RIVA	Ramus interventricularis anterior
KHK	Koronare Herzerkrankung, Koronare Herzkrankheit	SSC	Side Scatter
LVEDD	Left Ventricular End-Diastolic Diameter	SV	Schlagvolumen

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik III in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie am Universitätsklinikum Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Oliver Borst durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Jan Philipp Schütte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Oliver Borst und Mailin-Christin Manke.

Sämtliche in vivo Versuche, einschließlich der Methode zur experimentellen Induktion der myokardialen Ischämie und Reperfusion im Mausmodell, die gesamte kardiale Bildgebung durch Echokardiographie, Strain Analyse, präklinischer PET-MRT Bildgebung, Generierung der Proben und histologische Untersuchungen erfolgten in Durchführung und Auswertung durch Jan Philipp Schütte. Die Einarbeitung erfolgte dabei durch Dr. Jessica Sudmann und Mailin-Christin Manke. Für die Durchführung des Tierversuchsmodells erhielt Jan Philipp Schütte eine Ausnahmegenehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen.

Die Aufnahme der PET-MRT-Sequenzen erfolgte in Kooperation mit dem Werner Siemens Imaging Centers für präklinische Bildgebung unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Pichler.

Die miRNA Extraktion aus Thrombozyten und das Next-Generation-Sequencing erfolgten auf Grundlage der von Jan Philipp Schütte generierten Proben in Kooperation mit dem NGS Competence Center unter der Leitung von Dr. Nicolas Casadei und Unterstützung durch Michaela Pogoda.

Die Versuche zur Immunphänotypisierung der in das Myokard infiltrierenden Zellpopulationen erfolgten nach Generierung und Vorbereitung der Proben durch Jan Philipp Schütte in Kooperation mit Dr. Gustavo Ramos und Dr. Katherina Hemmen sowie Prof. Dr. Katrin Heinze des Universitätsklinikums Würzburg.

Der Versuch zur in vitro Makrophagen-Migration erfolgte durch Dr. Patrick Münzer, die Untersuchung in der Flusskammer erfolgten durch Ferdinand Kollotzek und die ex vivo Phänotypisierung der Thrombozyten erfolgten durch Dr. Patrick Münzer, Mailin-Christin Manke und Jan Philipp Schütte.

Die RT-PCR Messungen zur Dicer Expression in unterschiedlichen Zelltypen erfolgten durch Daniela Eißler.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie in Tübingen und Mailin-Christin Manke durch Jan Philipp Schütte. Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 18.01.2023

11 Danksagung

An erster Stelle der Personen, denen ich bei dieser Gelegenheit besonders herzlich danken möchte, steht sicher Herr Prof. Dr. med. Oliver Borst, leitender Oberarzt der Kardiologie mit Heisenberg-Professur für Thrombokardiologie am Universitätsklinikum Tübingen. Er hat mich mit dieser interessanten und herausfordernden Fragestellung betraut und mir damit die unschätzbare Chance gegeben, einen Grundstein für eine zukünftige Tätigkeit als klinisch-wissenschaftlich praktizierender Arzt zu legen. Ich danke ihm ganz besonders für sein Vertrauen, die hervorragende persönliche Betreuung als Arzt, Wissenschaftler und Mensch sowie den wertvollen Ratschlägen während meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Mein Dank gilt darüber hinaus Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, ärztlicher Direktor der Kardiologie am Universitätsklinikum Tübingen, für die von ihm geschaffenen Arbeitsbedingungen, die freundlicherweise zur Verfügung gestellten Forschungseinrichtung und die Einarbeitung durch seine wissenschaftliche Mitarbeiterin und Tierärztin Frau Dr. Jessica Sudmann in das experimentelle Tiermodell zur Induktion der myokardialen Ischämie und Reperfusion.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Nicolas Casadei und seinem Team für die großen Bemühungen und die gute Zusammenarbeit beim Next-Generation-Sequencing, Herrn Prof. Dr. Bernd Pichler und seinem Team für die zur Verfügung gestellten hervorragenden Infrastruktur und technischen Expertise im Werner Siemens Imaging Center für präklinische Bildgebung sowie Herrn Dr. Andreas Mack für die zur Verfügung gestellte Infrastruktur in dem Institut für klinischen Anatomie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Ebenfalls möchte ich mich bedanken bei Frau Prof. Dr. Katrin Heinze und Frau Dr. Katherina Hemmen sowie Dr. Gustavo Ramos für die hervorragende Kooperation, die interdisziplinäre Zusammenarbeit und technische Unterstützung im Rahmen des Sonderforschungsbereichs am Standort in Würzburg.

Abschließend möchte ich meinen ganz besonderen Dank den Mitarbeitern des Labors der Arbeitsgruppe Borst, insbesondere meiner persönlichen wissenschaftlichen Betreuerin Mailin-Christin Manke, Dr. Patrick Münzer, Ferdinand Kollotzek und Daniela Eißler für die hervorragende und geduldige Einarbeitung und Unterstützung im Labor, ihre exzellenten wissenschaftlichen Beiträge, die unnachgiebige Motivation sowie der zu jeder Zeit sehr angenehmen und menschlichen Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors aussprechen, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.