

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

MikroRNA-146a-basierte Mechanismen vaskulärer Fibrose im Kontext der arteriellen Gefäßversteifung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Karin Friederike Maria Mattern

aus

Recklinghausen

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: PD Dr. med. U. Raaz

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. T. R. Döppner

Prüfungskommission

Referent/in: PD Dr. med. U. Raaz

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. T. R. Döppner

Drittreferent/in: Prof. Dr. R. Dressel (Promotor)

Datum der mündlichen Prüfung: 11.10.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "MikroRNA-146a-basierte Mechanismen vaskulärer Fibrose im Kontext der arteriellen Gefäßversteifung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Altersbedingte arterielle Gefäßversteifung.....	1
1.1.1 Definition der arteriellen Gefäßversteifung	1
1.1.2 Auswirkungen und Auslöser der arteriellen Gefäßsteifigkeit.....	2
1.1.3 Mechanismen der arteriellen Gefäßversteifung.....	4
1.1.4 Fibrose im Gefäßkontext.....	6
1.1.5 Steifigkeitsmarkergene.....	10
1.2 MikroRNAs.....	10
1.2.1 Eigenschaften der miRs	11
1.2.2 MiR-146a in Physiologie und Pathologie	13
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Verwendete Materialien.....	16
2.2 Murine Aorten	20
2.3 Zellen	20
2.4 <i>In-vitro</i> -Arbeit.....	20
2.4.1 Allgemeine Zellkulturarbeit	20
2.4.2 Ausplattieren	21
2.4.3 Ernten	23
2.4.4 Transfektion.....	24
2.4.5 Behandlung <i>Scar-in-a-jar</i>	25
2.5 Molekulare Untersuchungen	26
2.5.1 RNA-Isolierung.....	26
2.5.2 RNA-Quantifizierung.....	28
2.5.3 Transkription von RNA zu cDNA	28
2.5.4 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion.....	29
2.6 Immunhistochemische Färbungen.....	32
2.6.1 Durchführung der Färbungen.....	32
2.6.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung.....	33
2.7 Statistik.....	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Die Expression von miR-146a ist in Aorten gealterter Mäuse erhöht	34
3.2 Erhöhte Matrixsteifigkeit reguliert Steifigkeitsmarker in HAoSMCs.....	34
3.3 miR-146a wird durch erhöhte Matrixsteifigkeit reguliert.....	35

3.4	miR-146a reguliert profibrotische Gene in HAoSMCs.....	36
3.5	<i>Knockdown</i> -Analyse mit <i>SMAD3</i> siRNA	37
3.6	miR-146a reguliert die Kollagensynthese in HAoSMCs	39
4	Diskussion	41
4.1	Diskussion der Hypothesen	41
4.1.1	miR-146a wird in gealterten Aorten vermehrt exprimiert	41
4.1.2	miR-146a wird in Abhängigkeit der Matrixsteifigkeit exprimiert	42
4.1.3	miR-146a reguliert <i>SMAD3</i> und <i>PLOD2</i> als profibrotische Gene.....	43
4.1.4	miR-146a reguliert <i>PLOD2</i> in Abhängigkeit von <i>SMAD3</i>	44
4.1.5	miR-146a hemmt die Synthese von Kollagenmolekülen	46
4.2	Allgemeine Limitationen	48
4.3	Ausblick	48
4.3.1	Ergänzende Untersuchungen	48
4.3.2	Weitere Endpunkte.....	49
4.3.3	Translation der Ergebnisse	50
5	Zusammenfassung	51
6	Anhang.....	53
6.1	Analysenzertifikat der HAoSMCs	53
7	Literaturverzeichnis.....	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathomechanismen der altersbedingten arteriellen Gefäßversteifung.....	3
Abbildung 2: Mechanismen der altersbedingten arteriellen Gefäßversteifung.....	5
Abbildung 3: Synthese der Kollagen- <i>Crosslinks</i>	9
Abbildung 4: Biosynthese der miRs und miR-Sequenz am Beispiel von miR-146a.....	11
Abbildung 5: Etablierung der Kollagenbeschichtung.....	23
Abbildung 6: Genexpression von miR-146a in murinem Aortengewebe	34
Abbildung 7: Genexpression der Steifigkeitsmarkergene in HAoSMCs auf unterschiedlich steifen Zellkulturplatten.....	35
Abbildung 8: Genexpression von miR-146a in HAoSMCs auf unterschiedlich steifen Zellkulturplatten	36
Abbildung 9: MiR-146a-Modulation in HAoSMCs	37
Abbildung 10: <i>SMAD3</i> siRNA <i>Knockdown</i> in HAoSMCs	38
Abbildung 11: <i>SMAD3</i> siRNA <i>Knockdown</i> und miR-146a Modulation in HAoSMCs.....	39
Abbildung 12: <i>Scar-in-a-jar Assay</i> in HAoSMCs	40
Abbildung 13: Schema des zugrundeliegenden Signalwegs	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellen	16
Tabelle 2: Medien	16
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	16
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien	16
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien	17
Tabelle 5: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	17
Tabelle 6: Primer	18
Tabelle 7: Antikörper.....	18
Tabelle 8: Modulatoren	18
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 10: Geräte	19
Tabelle 11: Software.....	20
Tabelle 12: Ansatz des Reaktionsgemischs für die reverse Transkription	28
Tabelle 13: Protokoll der reversen Transkription	28
Tabelle 14: Ansatz des Reaktionsgemischs für die reverse Transkription von miRs	29
Tabelle 15: Verwendete <i>primer</i> für die reverse Transkription von miRs	29
Tabelle 16: Protokoll der reversen Transkription von miRs	29
Tabelle 17: Ansatz des Reaktionsgemischs für die RT-qPCR.....	31
Tabelle 18: Verwendete <i>primer</i> bei der RT-qPCR.....	31
Tabelle 19: Ansatz des Reaktionsgemischs für die RT-qPCR der miRs.....	31
Tabelle 20: Verwendete <i>primer</i> bei der RT-qPCR der miRs	31
Tabelle 21: Protokoll der RT-qPCR.....	31

Abkürzungsverzeichnis

ANKRD1	<i>cardiac ankyrin repeat protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CT	<i>cycles of threshold</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DxS	Dextransulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
H1-5	Hypothese 1-5
HAoSMC	<i>human aortic smooth muscle cells</i>
HP	Hydroxylsilylpyridinoline
IRAK1	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
LH	Lysylhydroxylase
LOX	Lysyloxidase
LP	Lysylpyridinoline
LPS	Lipopolysaccharide
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
miR	MikroRNA
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	<i>messengerRNA</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROI	<i>regions of interest</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	<i>real time quantitative PCR</i>
Opti-MEM	<i>optimal minimal essential medium</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PLOD	<i>procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
SmBM	<i>smooth muscle cell basal medium</i>
SmGM-2	<i>smooth muscle cell growth medium 2</i>
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
TAZ	<i>transcriptional coactivator with PDZ-binding motif</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TIMPS	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNS	<i>trypsin neutralizing solution</i>
TRAF6	<i>TNF receptor associated factor 6</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>
YAP	<i>yes-associated protein</i>

1 Einleitung

1.1 Altersbedingte arterielle Gefäßversteifung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den häufigsten Krankheitsbildern und sind eine der Haupttodesursachen in Europa. Jährlich sterben daran ungefähr 3,9 Millionen Menschen (Wilkins et al. 2017). Bei insgesamt ungefähr 8,9 Millionen Todesfällen in Europa bedeutet dies, dass knapp die Hälfte aller Europäer an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung versterben. In diesem Zusammenhang haben epidemiologische Studien mittlerweile eindeutig gezeigt, dass der Alterungsprozess bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt und deshalb einen der Risikofaktoren darstellt (Laurent et al. 2006). Im Gefäßsystem manifestiert sich das Alter als zunehmende Gefäßversteifung und gilt damit als wichtigste Ursache der arteriellen Gefäßsteifigkeit (Ferrari et al. 2003; Lyle und Raaz 2017; Stepan et al. 2011; Ungvari et al. 2010). Daraus erschließt sich, dass das vaskuläre, biologische Alter, gemessen anhand der Gefäßsteifigkeit, im Vergleich zum chronologischen Alter eine zuverlässigere Aussage über die kardiovaskuläre Prognose treffen könnte (Groenewegen et al. 2016).

Die altersbedingte arterielle Gefäßversteifung ist daher als eigenständiges Krankheitsbild anerkannt (Laurent et al. 2001). Die derzeitige Forschung beschäftigt sich ausgiebig mit den Auslösern, Auswirkungen und molekularen Mechanismen, die der Gefäßversteifung zugrunde liegen, welche daher in den folgenden Abschnitten weiter erläutert werden.

1.1.1 Definition der arteriellen Gefäßversteifung

Arterielle Gefäßversteifung (*engl. arterial stiffness, arterial stiffening*) ist ein Oberbegriff, der strukturelle und funktionelle Eigenschaften des arteriellen Gefäßsystems zusammenfasst. Dabei führen verschiedene Mechanismen und Vorgänge zu einer abnehmenden Elastizität des Gewebes.

Unter physiologischen Bedingungen herrscht im Gefäßsystem ein Steifigkeitsgradient von proximalen, elastischen zu distalen, muskulären Arterien (Palombo und Kozakova 2016). Die Aorta, als größtes Gefäß des Körpers, transportiert daher nicht lediglich das sauerstoffreiche Blut vom linken Herzen zu den kleineren Arterienästen und Organen, sondern übernimmt auch eine wichtige hämodynamische Rolle. Mithilfe ihrer elastischen Wandeigenschaften dehnt sie sich entsprechend dem systolischen Druck des Herzens und speichert dabei einen Teil der Herzarbeit sowie des ausgeworfenen Blutvolumens. Beides gibt sie durch die elastischen Rückstellkräfte anschließend während der Diastole frei, wodurch ein gleichmäßiger Blutfluss erreicht wird. Dieser Vorgang wird Windkesselleffekt genannt (Laurent et al. 2006; Nichols und McDonald 1972).

Die Geschwindigkeit der während der Systole entstandenen Pulswelle kann so verringert werden. An den Verzweigungen der distalen Gefäße des Arteriensystems wird diese Pulswelle reflektiert und trifft während der Diastole zurück auf die aufsteigende Aorta. Alles in allem wird durch das Zusammenspiel der Drücke, der Pulswelle und des Windkesselleffektes der vom Herzen ausgeworfene pulsierende Blutfluss zunehmend laminarer (Vlachopoulos et al. 2011).

In einem steifen Arteriensystem reagiert die Aorta jedoch rigider und weniger dehnbar. Das systolisch ausgeworfene Blutvolumen wird schlechter von der Aorta aufgefangen. Die systolisch erzeugte arterielle Pulswelle fließt daher mit erhöhter Geschwindigkeit durch das Gefäßsystem und wird schon während der Systole wieder auf die aufsteigende Aorta zurückgeworfen. Der systolische Druck nimmt dadurch zu und der diastolische Druck ab (Laurent et al. 2006; Palombo und Kozakova 2016).

1.1.2 Auswirkungen und Auslöser der arteriellen Gefäßsteifigkeit

Diese hämodynamischen Veränderungen haben fatale Folgen für das Herz-Kreislauf-System. Die abnehmende Elastizität der Aorta und der damit verbundene Anstieg des systemischen Blutdruckes schädigt vor allem Organe, deren empfindliche Mikrozirkulationssysteme nicht vor hohen systemischen Gefäßdrücken geschützt sind. Dies sind vor allem das Gehirn und die Nieren (O'Rourke und Hashimoto 2007; Safar und Lacolley 2007). Zu den Erkrankungen der Mikrozirkulation gehören zerebrale Mikroläsionen einhergehend mit kognitiver Beeinträchtigung und chronische Niereninsuffizienz. (Abbildung 1)

Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass eine kognitive Beeinträchtigung und zerebrale Läsionen vermehrt bei älteren Patient:innen mit arterieller Gefäßversteifung auftreten (Palta et al. 2019; Poels et al. 2012). Die AGES-Reykjavik Studie konnte darüber hinaus zeigen, dass eine erhöhte Karotis-Steifigkeit bei über 65-jährigen Patient:innen einen unabhängigen Risikofaktor für zerebrale Mikroblutungen darstellt, die wiederum mit einem erhöhten Risiko für Schlaganfälle verbunden sind (Ding et al. 2015). Bei Patient:innen mit einer chronischen Niereninsuffizienz im Endstadium waren eine versteifte Aorta und ein verminderter Innendurchmesser der Karotisarterie unabhängige Prädiktoren für erhöhte Mortalität (Karras et al. 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei Patient:innen mit einer chronischen Niereninsuffizienz im Frühstadium eine erhöhte arterielle Steifigkeit und ein verminderter Innendurchmesser der Karotisarterie mit einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate sowie der Abnahme der generellen Nierenfunktion korrelierten (Briet et al. 2006).

Neben den Auswirkungen auf die Mikrozirkulationssysteme hat die zunehmende Steifigkeit der Aorta auch Auswirkungen auf den Herzmuskel selbst. Der erhöhte systemische Druck im Gefäßsystem erfordert eine Steigerung der Herzarbeit, wodurch auch der Sauerstoffbedarf des Herzmuskelgewebes steigt. Die Sauerstoffversorgung des Herzens

erfolgt über die Koronarperfusion, welche während der Diastole stattfindet. Aufgrund des Verlustes des Windkessel-effektes und der frühzeitig zurückgeworfenen Pulswelle im steifen Gefäßsystem fehlen während der Diastole allerdings entscheidende Anteile des sonst zur Verfügung stehenden Blutvolumens für die Koronarperfusion. Im steifen Gefäßsystem steigt also der Sauerstoffbedarf des Herzmuskels aufgrund vermehrter Herzarbeit, gleichzeitig sinkt das Sauerstoffangebot während der Diastole aufgrund des verminderten Blutvolumens in der Aorta (O'Rourke und Hashimoto 2007; Palombo und Kozakova 2016). Dies hat Ischämie und Herzinsuffizienz zur Folge. Eine erhöhte arterielle Gefäßversteifung erhöht daher das Risiko für die Entstehung einer Herzinsuffizienz (Chirinos et al. 2012; Tsao et al. 2015). (Abbildung 1)

Neben den Auswirkungen auf die Mikrozirkulation und den Herzmuskel beeinflusst die arterielle Gefäßversteifung nachweislich auch die Entstehung von weiteren kardiovaskulären Erkrankungen. Raaz et al. (2015a) zeigten in ihrer Arbeit beispielsweise, dass eine erhöhte arterielle Gefäßversteifung zu einer Veränderung der Zusammensetzung von Proteinen, Zellen und Botenstoffen in der Wand eines Gefäßes führt und hierdurch die Formation von Aortenaneurysmen begünstigt wird. Ebenso deuten zahlreiche Studien darauf hin, dass die arterielle Gefäßversteifung die Entstehung von Arteriosklerose begünstigt (Hansen und Taylor 2016; Mattace-Raso et al. 2006).

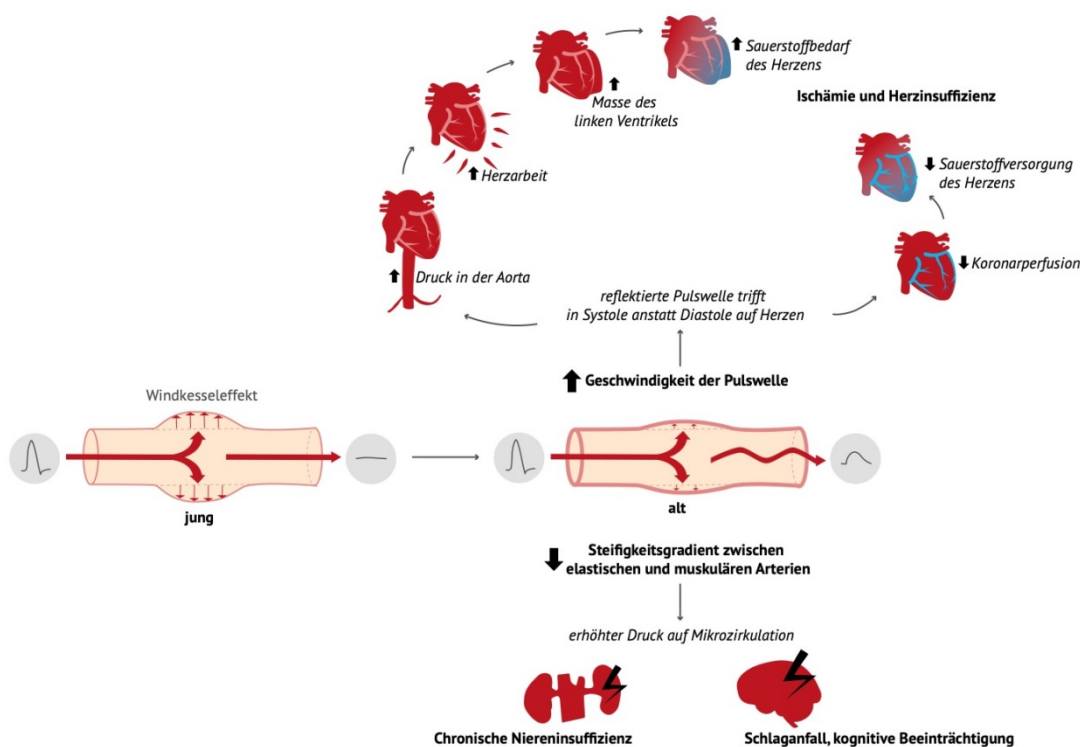


Abbildung 1: Pathomechanismen der altersbedingten arteriellen Gefäßversteifung. (basierend auf O'Rourke und Hashimoto (2007))

Neben diesen fatalen Auswirkungen wurden auch Auslöser der arteriellen Gefäßversteifung bereits untersucht. Als zentrale Ursache wurde hierbei die Alterung des menschlichen Körpers festgestellt (Greenwald 2007). Die Faktoren, die zur vorzeitigen Alterung beitragen, decken sich mit den Risikofaktoren, die bereits für kardiovaskuläre Erkrankungen anerkannt sind: Bluthochdruck, metabolische Erkrankung (Diabetes mellitus, Übergewicht, Hyperlipidämie) und Rauchen (Amar et al. 2001; Benetos et al. 2002; Mahmud und Feely 2003; Safar et al. 2006).

Unabhängig vom kardiovaskulären Risikoprofil zeigen auch Patient:innen mit angeborenen Erkrankungen des Bindegewebes ein erhöhtes Risiko für arterielle Gefäßversteifung. Die den Erkrankungen zugrunde liegenden genetisch bedingten Veränderungen des Aortengewebes führen zu einer frühzeitigen Entstehung von arterieller Gefäßversteifung. Die steife Aorta ist daraufhin nachweislich anfälliger für Aortendissektionen, die ein erhebliches Mortalitätsrisiko haben (Prakash et al. 2015).

Zusammenfassend stellt eine erhöhte arterielle Gefäßversteifung einen wichtigen Faktor für die Entstehung von zahlreichen Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems dar. Die Auslöser der arteriellen Gefäßversteifung decken sich ebenfalls vielfach mit den allgemein anerkannten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen. Mitchell et al. (2010) konnten sogar zeigen, dass eine erhöhte arterielle Gefäßversteifung einen eigenständigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse darstellt.

1.1.3 Mechanismen der arteriellen Gefäßversteifung

Die arterielle Gefäßversteifung betrifft besonders die Aorta als zentrales Kapazitätsgefäß des Körpers und entsteht durch ein komplexes Zusammenspiel von strukturellen und zellulären Veränderungen in der Gefäßwand.

Die Gefäßwand der Aorta ist aus drei Schichten aufgebaut. Die innerste Schicht wird Intima genannt und besteht aus einer Schicht von Endothelzellen, die in Verbindung mit zirkulierendem Blut stehen. Nach einer elastischen Grenzschicht (*Lamella elastica interna*) schließt sich die mittlere Schicht, die Media, an. Die Media ist die dickste Schicht und enthält neben glatten Gefäßmuskelzellen hauptsächlich extrazelluläre Matrix bestehend aus Elastin, Kollagen und Proteoglykanen. Peripher bildet die Adventitia den Abschluss. Sie verankert das Gefäß mithilfe von Bindegewebe im umgebenden Gewebe (Welsch et al. 2018). Die Pathomechanismen der arteriellen Gefäßversteifung spielen sich mehrheitlich in der Media ab (Lakatta 2003). In histologischen Schnitten von steifen Arterien zeigten sich dort im Vergleich zu gesunden Gefäßschnitten deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix und der vorkommenden Zellen und Enzyme (Lakatta 2003). Diese Unterschiede sind mit den der arteriellen Gefäßversteifung zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu erklären.

Die Seneszenz und Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMCs) hinterlässt Narben und führt zu verminderter Syntheseleistung innerhalb des Gewebes (Qiu H et al. 2010). (Abbildung 2)

Vermehrte Infiltration von Makrophagen, Monozyten, Zelladhäsionsmolekülen und Zytokinen, die sich in den histologischen Schnitten nachweisen lassen, sind Teil der chronischen Inflammation, die sich bei Patient:innen mit erhöhter arterieller Steifigkeit auch im Blut nachweisen lässt (Booth et al. 2004). (Abbildung 2)

Weiterhin findet sich bei der arteriellen Gefäßversteifung eine vermehrte Kalzifikation von Proteinen der Extrazellulärmatrux (Niederhoffer et al. 1997; Raaz et al. 2015b) und ein erhöhtes Vorkommen von reaktiven Sauerstoffspezies (Byon et al. 2008; Delles et al. 2008; Raaz et al. 2015b). (Abbildung 2)

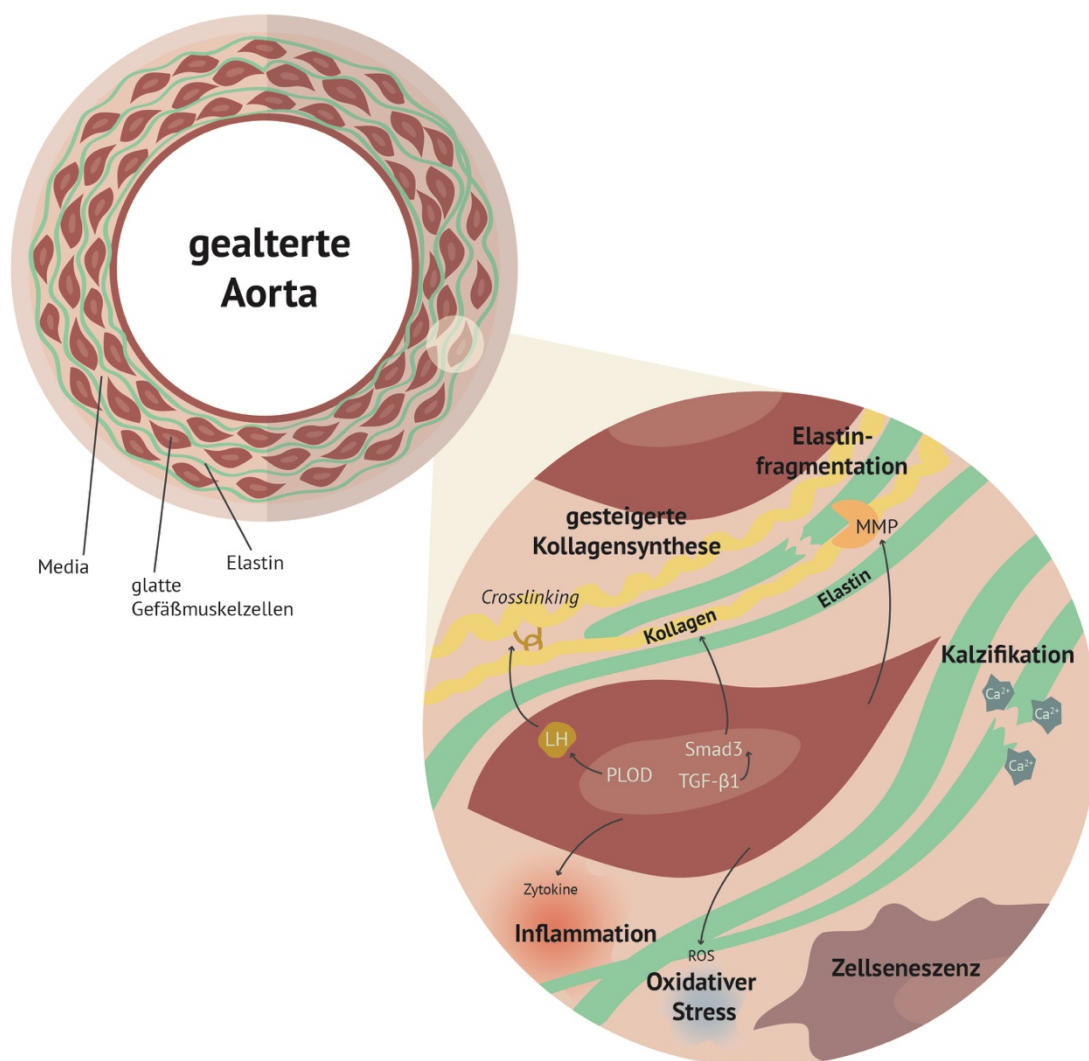


Abbildung 2: Mechanismen der altersbedingten arteriellen Gefäßversteifung

Die Schnitte zeigen außerdem gehäuft Kollagene sowie gebrochenes und fragmentiertes Elastin. Gleichzeitig lassen sich vermehrt *Tissue growth factor beta* (TGF- β), ein Wachstumsfaktor, der in engem Zusammenhang mit der Kollagensynthese steht (Roberts et al. 1986), und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) nachweisen. MMPs können Matrixproteine wie Elastin und Kollagen abbauen und sind damit wichtige Gegenspieler der Synthese (Van Doren 2015). Kollagen und Elastin gewährleisten in der Arterienwand Stabilität und Elastizität. Elastin sorgt für Elastizität und Dehnbarkeit der Gefäßwand. Kollagen, das 100- bis 1000-mal steifer ist, sorgt für die nötige Stabilität (Wagenseil und Mecham 2009; 2012). Sie stehen in Synthese und Abbau im ausgewogenen Einklang.

Elastin wird mit zunehmendem Alter und zunehmender Beanspruchung dünner und bricht (O'Rourke und Hashimoto 2007). Außerdem wird es durch MMPs vermehrt abgebaut. Verschiedene Studien zeigen die erhöhte Aktivität von MMPs bei arterieller Gefäßversteifung, was für ein gestörtes Elastin-Kollagen Verhältnis spricht: Wang M et al. (2007) fanden erhöhte Level an MMPs bei der histologischen Untersuchung von Aorten, die von alten Patient:innen gewonnen wurden im Vergleich zu Aorten, die von jungen Patient:innen ohne kardiovaskuläre Todesursachen gewonnen wurden. Kardiovaskulär nicht vorerkrankte Patient:innen mit erhöhter Gefäßsteifigkeit wiesen zudem hohe Level an MMPs im Blut auf (Yasmin et al. 2005). Die Elastinproduktion findet hauptsächlich während der Neugeborenenphase und den ersten Lebensjahren statt und nimmt mit zunehmendem Alter immer weiter ab (Lescan et al. 2018). Es findet daher keine ausreichende Regeneration des fragmentierten Elastins mehr statt und die Dehnbarkeit und Elastizität der Aortenwand vermindert sich dauerhaft. Die vermehrte Elastinfragmentation im Alter stellt damit einen wichtigen Mechanismus der arteriellen Gefäßversteifung dar. (Abbildung 2)

In der Aorta findet man hauptsächlich Kollagene vom Typ I oder III und teilweise vom Typ IV (Cattell et al. 1996; Wagenseil und Mecham 2009). Die Kollagenmenge in der Aorta nimmt mit dem Alter nachweislich zu (Wang M et al. 2007). Das Verhältnis von Elastin zu Kollagen in der Media nimmt damit kontinuierlich ab, was zu einer zunehmenden Versteifung der Arterienwand beiträgt. Die zunehmende Kollagenmenge in der Aorta und die damit verbundene Fibrose des Gewebes stellen einen weiteren entscheidenden Mechanismus der arteriellen Gefäßversteifung dar. (Abbildung 2) Der folgende Abschnitt erläutert daher einige Aspekte der vaskulären Fibrose tiefergehend.

1.1.4 Fibrose im Gefäßkontext

Als Fibrose wird die pathologische Anhäufung von Bindegewebsproteinen, wie Kollagenen in Geweben definiert. Dies führt zur Verhärtung und Vernarbung des Gewebes (Wynn 2008). Einen zentralen Mechanismus der Fibrose stellt daher die gesteigerte Kollagensynthese dar. Der genaue Ablauf der Biosynthese des Kollagens lässt sich dabei wie folgt beschreiben: Nach der Translation des Prokollagens finden verschiedene post-translationale Modifikationen wie Hydroxylierung und Glykosylierung der Moleküle statt,

sodass sich die Moleküle anschließend als Prokollagen-*Triple*-Helix zusammenlagern können. Im Anschluss werden die Proteine aus dem Zellkern ins Zytosol geschleust. Dort wird die Prokollagen-*Triple*-Helix an beiden Enden zum Kollagenmonomer prozessiert. Mehrere Kollagenmonomere werden im Anschluss zu Mikrofibrillen durch den Vorgang des kovalenten *Crosslinking* miteinander verbunden (Yamauchi und Sricholpech 2012).

Die Kollagensynthese steht in engem Zusammenhang mit dem TGF- β -Signalweg. Roberts et al. (1986) konnten erstmals zeigen, dass TGF- β die Synthese von Matrixproteinen steigert. Inzwischen sind drei Unterformen von TGF- β bekannt: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3. Im Herzkreislaufsystem ist TGF- β 1 die wichtigste Form und kommt unter anderem in VSMCs vor (Annes et al. 2003). Die TGF- β -Signalkaskaden sind komplex und Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Sie spielen unter anderem auch in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Atherosklerose, kardialer Fibrose und vaskulärer Fibrose eine wichtige Rolle (Ruiz-Ortega et al. 2007).

Im Rahmen der vaskulären Fibrose konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 die Synthese von Matrixproteinen erhöht. Dazu gehören beispielsweise Kollagen oder das Glykoprotein Fibronectin (Verrecchia und Mauviel 2002). TGF- β 1 ist außerdem dafür verantwortlich, dass der Abbau dieser Matrixproteine nicht mehr funktioniert, indem es die Produktion von Kollagenasen hemmt und die Produktion von *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMPs) fördert (Harvey et al. 2016). TIMPs würden normalerweise wiederum die MMPs hemmen, die neben Elastin auch Kollagen abbauen (Lambert et al. 2004). Damit sorgt TGF- β 1 für eine vermehrte Akkumulation und gleichzeitig einen verminderten Abbau von Matrixproteinen, was beides zur Fibrose des Gefäßes beiträgt.

Da die gesteigerte Kollagensynthese und die damit verbundene Fibrose des Gefäßes einen wichtigen Mechanismus der arteriellen Gefäßversteifung darstellt, ist nachvollziehbar, dass TGF- β 1 auch in die Entstehung der altersbedingten arteriellen Gefäßversteifung involviert ist. Wang M et al. (2006) haben in diesem Zusammenhang herausgefunden, dass aktiviertes TGF- β 1, die TGF- β -Rezeptoren und das TGF- β 1-*Signaling* in der Wand von Aorten gealterter Ratten gegenüber Aorten junger Ratten erhöht sind. TGF- β 1 vermittelt seine Wirkung in VSMCs oder Endothelzellen dabei bekanntermaßen über die SMAD-Signalkaskade (Massague et al. 2005). (Abbildung 2) Da SMAD3 entscheidender Bestandteil dieser Arbeit war, wird diese Kaskade im Folgenden genauer erläutert.

1.1.4.1 SMAD3 im Kontext der vaskulären Fibrose

Die SMAD-Proteine liegen zunächst im Zytoplasma vor und wandern nach Aktivierung durch TGF- β 1 in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren fungieren (Ruiz-Ortega et al. 2007). Es sind bislang acht verschiedene Proteine der SMAD-Familie beschrieben worden, die entsprechend ihrer Funktion in drei Kategorien eingeteilt werden. Dabei werden SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 und SMAD8 zu den rezeptoraktivierten SMADs gezählt. SMAD4 wird als *Cofactor* SMAD bezeichnet, da es immer als Komplex zusammen

mit anderen SMADs agiert. SMAD6 und SMAD7 sind inhibitorische SMADs und wirken als negative Regulatoren der rezeptoraktivierten SMADs (Massague et al. 2005).

In VSMCs läuft die TGF- β 1-Signalkaskade hauptsächlich über SMAD2 und SMAD3 ab. TGF- β 1 aktiviert den TGF- β -Rezeptor, der die Proteine SMAD2 und SMAD3 phosphoryliert. Diese bilden gemeinsam mit SMAD4 einen Komplex, der im Anschluss in den Zellkern wandert und dort als Transkriptionsfaktor die Expression von Kollagen I und Fibronectin steigert. Gegenspieler dieser Kaskade ist SMAD7, welche die TGF- β 1 induzierte Synthese dieser Proteine vermindert (Dennler et al. 1998; Ruiz-Ortega et al. 2007). Isono et al. (2002) konnten im murinen Zellmodell zeigen, dass eine übermäßige Expression von *Smad3* die Promotoraktivität von Fibronectin steigert. Dieser Effekt war bei Zellen ohne *Smad3* sowie bei Zellen, bei denen zusätzlich *Smad7* übermäßig exprimiert wurde, nicht mehr feststellbar. Wang W et al. (2006) zeigten, dass die Aktivierung von *SMAD3* in humanen VSMCs essentiell für die Entstehung vaskulärer Fibrose ist. Sie induzierten die Kollagensynthese mittels Angiotensin II, einem Peptid, welches vaskuläre Inflammation und Fibrose steigert (Ruiz-Ortega et al. 2003). Die Expression von Kollagen war in VSMCs vom Wildtyp im Vergleich zu VSMCs ohne *SMAD3* deutlich gesteigert. Die TGF- β 1/SMAD3-Signalkaskade ist demnach Teil der pathologischen Vorgänge, die der vaskulären Fibrose zugrunde liegen.

Damit ist diese Kaskade möglicherweise auch bei der gesteigerten Kollagensynthese im Rahmen der Entstehung von arterieller Gefäßversteifung beteiligt. Bisher gibt es allerdings noch keine Studien zur Rolle von SMAD3 bei der arteriellen Gefäßversteifung.

1.1.4.2 *PLOD2* im Kontext der vaskulären Fibrose

Neben *SMAD3* wurde auch *procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2)* in dieser Arbeit eingehender untersucht. Im Kontext der vaskulären Fibrose hat *PLOD2* entscheidenden Anteil an der Synthese der Kollagen-*Crosslinks*. Im letzten Schritt der Kollagensynthese werden, wie oben bereits erläutert, Querverbindungen zwischen den Kollagenmonomeren gebildet. Diese sogenannten Kollagen-*Crosslinks* sind wichtig für die langfristige Stabilität von Kollagenproteinen. Sie entstehen zwischen Lysinresten und Hydroxylysinresten, die aus den Monomeren herausragen. Lysinreste werden dabei von der Lysyloxidase (LOX) in Allysine und Hydroxylysinreste in Hydroxyallysine konvertiert. Diese unterschiedlichen Synthesewege werden daher Allysin-Weg und Hydroxyallysin-Weg genannt. Anschließend reagieren diese Allysine und Hydroxyallysine wiederum mit Lysin oder Hydroxylysinen zur den reifen *Crosslinks*. Die reifen *Crosslinks* werden dann entweder Lysylpyridinoline (LP) oder Hydroxylsilylpyridinoline (HP) genannt (Eyre et al. 1984). (Abbildung 3)

Lysinreste können allerdings auch zunächst hydroxiliert werden und im Anschluss über den Hydroxyallysin-Weg anstelle des Allysin-Wegs *Crosslinks* bilden. Diese Hydroxilierung wird vom Enzym Lysylhydroxylase (LH) katalysiert. Es gibt die drei Unterformen LH1, LH2 und

LH3, die jeweils von den Genen *PLOD1*, *PLOD2* und *PLOD3* kodiert werden (Van der Slot et al. 2003). Für die Bildung der LP und HP sind allerdings nur die Hydroxylierungen, die über *PLOD2* und LH2 ablaufen, wichtig (Gjaltema et al. 2015; Takaluoma et al. 2007). Die Aktivität der LH2 ist somit dafür entscheidend, ob vermehrt LP oder HP gebildet werden. (Abbildung 2)

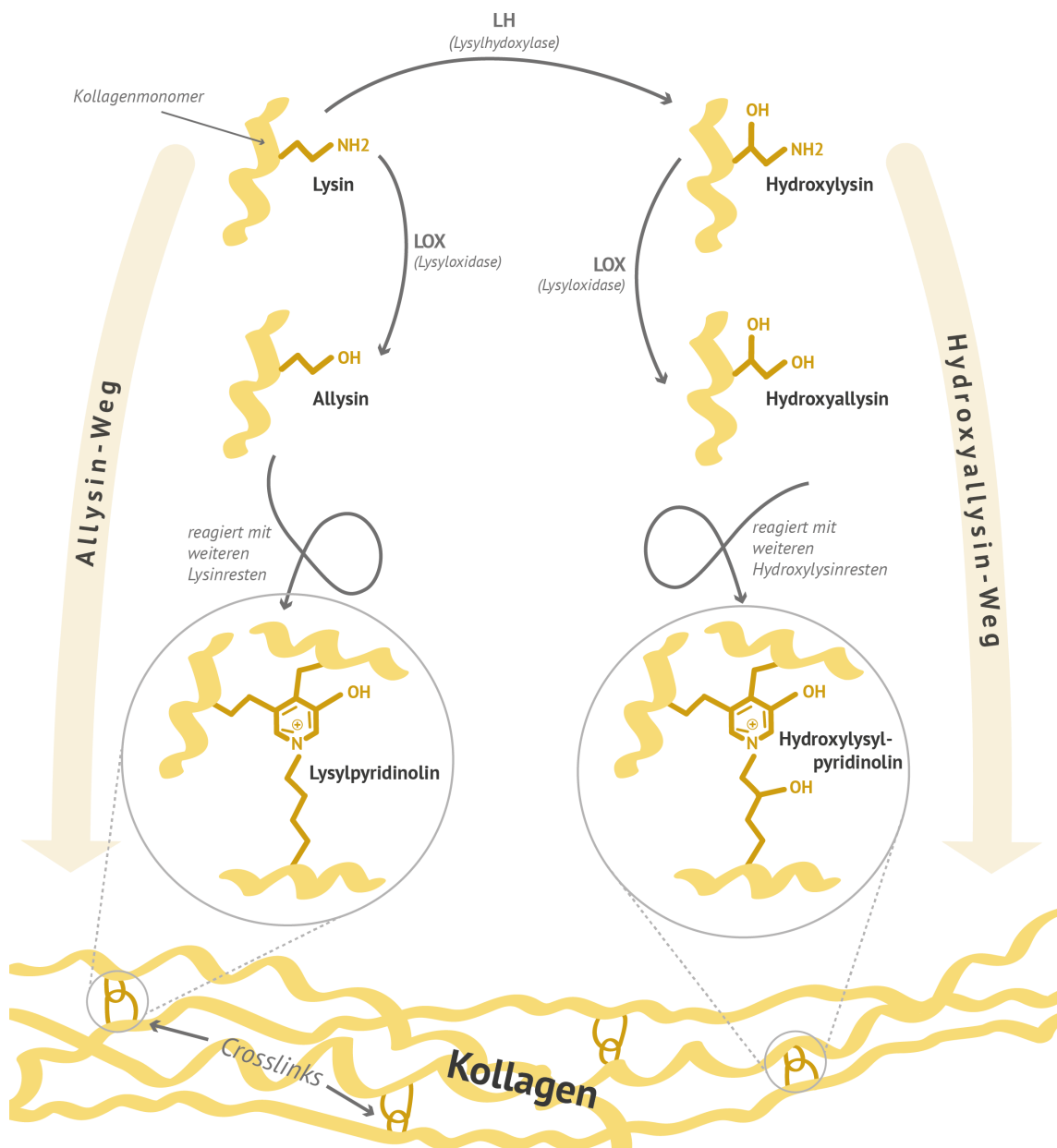


Abbildung 3: Synthese der Kollagen-Crosslinks (basierend auf Eyre et al. (1984))

Es konnte gezeigt werden, dass besonders die *Crosslinks* aus dem Hydroxyallylsin-Weg vermehrt in fibrotischer Haut und auch anderen fibrotischen Organen wie Lunge und Leber vorkommen (Last et al. 1990; Uzawa et al. 1998). Van der Slot-Verhoeven et al. (2005) konnten außerdem im Tiermodell zeigen, dass Kollagenakkumulation in vernarbtem Gewebe ohne Pyridinolin-Crosslinks wieder zurückgebildet werden kann. Das Maß an HP ist somit ausschlaggebend für das Ausmaß und die Irreversibilität der Fibrose. Somit könnte die

Regulation von *PLOD2* ein interessanter Ansatz sein, um das vermehrte Vorkommen von HP in fibrotischem Gewebe zu erklären.

Gjaltema et al. (2015) untersuchten daher die Regulation von *PLOD2* im Zellmodell und fanden, dass eine Stimulation von Fibroblasten mit TGF- β 1 die Expression von *PLOD2* erhöhte. Außerdem zeigten sie, dass dieser Effekt über den Transkriptionsfaktor SMAD3 vermittelt wird. Damit ist *PLOD2* ein wichtiges Gen während der TGF- β 1/SMAD3-abhängigen Regulation von Fibrose.

Denkbar ist, dass das Vorkommen der *Crosslinks* in Abhängigkeit der Regulation durch SMAD3 und *PLOD2* auch während der gesteigerten Kollagensynthese im Rahmen der Entstehung von arterieller Gefäßversteifung erhöht ist. Dieser Aspekt wurde bisher jedoch noch nicht weitergehend untersucht.

1.1.5 Steifigkeitsmarkergene

Ob ein Gewebe oder eine Matrix steif ist oder nicht muss für den experimentellen Aufbau klar definiert werden. Die Steifigkeit wird dabei je nach Modellorganismus und Organ unterschiedlich gemessen. Für die arterielle Gefäßversteifung kann bei Patient:innen mithilfe von Ultraschall Diagnostik die Pulswellengeschwindigkeit gemessen werden, die Rückschlüsse auf die Steifigkeit der Gefäße gibt (O'Rourke und Hashimoto 2007). Die Elastizität von explantierten Aorten von Tieren kann mithilfe von Myographen quantifiziert werden (Amin et al. 2012).

Zur Kontrolle von Steifigkeit im Zellmodell werden Steifigkeitsmarkergene genutzt, die auf Änderungen der umgebenen Matrixsteifigkeit hin hochreguliert werden und anzeigen, ob der Zellorganismus auf eine steife Umgebung reagiert hat. Dazu gehören beispielsweise *connective tissue growth factor* (CTGF) und *cardiac ankyrin repeat protein* (ANKRD1). Beide Gene werden von mechanosensitiven Transkriptions-Kofaktoren, wie YAP/TAZ (*yes associated protein/transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*), reguliert. YAP/TAZ reagieren nachweislich auf Änderungen der Matrixsteifigkeit oder der Zellform (Dupont S et al. 2011).

1.2 MikroRNAs

Die vorliegende Arbeit untersuchte mikroRNA (miRs) basierte Mechanismen im Kontext der arteriellen Gefäßversteifung. Aus diesem Grund werden nun zunächst die Eigenschaften der miRs näher betrachtet.

Ursprünglich wurde angenommen, dass jedes Gen im Genom für jeweils ein zugehöriges Protein kodiert. Später zeigte sich, dass nur rund 3 % des menschlichen Genoms in Proteine übersetzt werden. Mittlerweile ist bekannt, dass der überwiegende Teil des Genoms für sogenannte nicht-kodierende RNAs (*ribonucleic acid*) kodiert. Zu diesen gehören unter anderem auch die mikroRNAs (Bartel 2004).

1.2.1 Eigenschaften der miRs

Die erste miR, *lin-4*, wurde 1993 im Genom von *Caenorhabditis elegans* von Lee RC et al. (1993) entdeckt. In den folgenden Jahren wurden hunderte weitere miRs identifiziert (Lagos-Quintana et al. 2001; Lee RC und Ambros 2001).

MiRs sind kurze, etwa 23 Nukleotide lange post-transkriptionelle Regulatoren, die in nahezu allen biologischen Prozessen involviert sind, wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Metabolismus und Entwicklung (Ameres und Zamore 2013).

Die Biogenese der miRs beginnt durch die RNA-Polymerase II, die eine komplementäre RNA-Sequenz von einer Sequenz auf der *desoxy ribonucleic acid* (DNA) transkribiert (Lee Y et al. 2004). Im Anschluss wird die so entstandene Pri-miR durch einen Enzymkomplex bestehend aus RNAase Typ III Drosha und dem DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) Kofaktorprotein gekürzt (Han et al. 2004). Diese Pre-miR wird aus dem Zellkern transportiert (Bohnsack et al. 2004) und dort ein zweites Mal vom Enzymkomplex *Dicer* zusammen mit dem *TAR RNA binding protein* gekürzt (Ha und Kim 2014; Ketting et al. 2001). Der so entstandene kürzere Pre-miR-Doppelstrang wird entwickelt und der Leitstrang ausgewählt. Dieser lagert sich mit dem RISC(*RNA-induced silencing complex*)-Enzymkomplex zu einem reifen miRISC-Komplex zusammen (Ha und Kim 2014). Der miRISC-Komplex kann nun an die *messengerRNA* (mRNA) eines der Zielgene binden. (Abbildung 4)

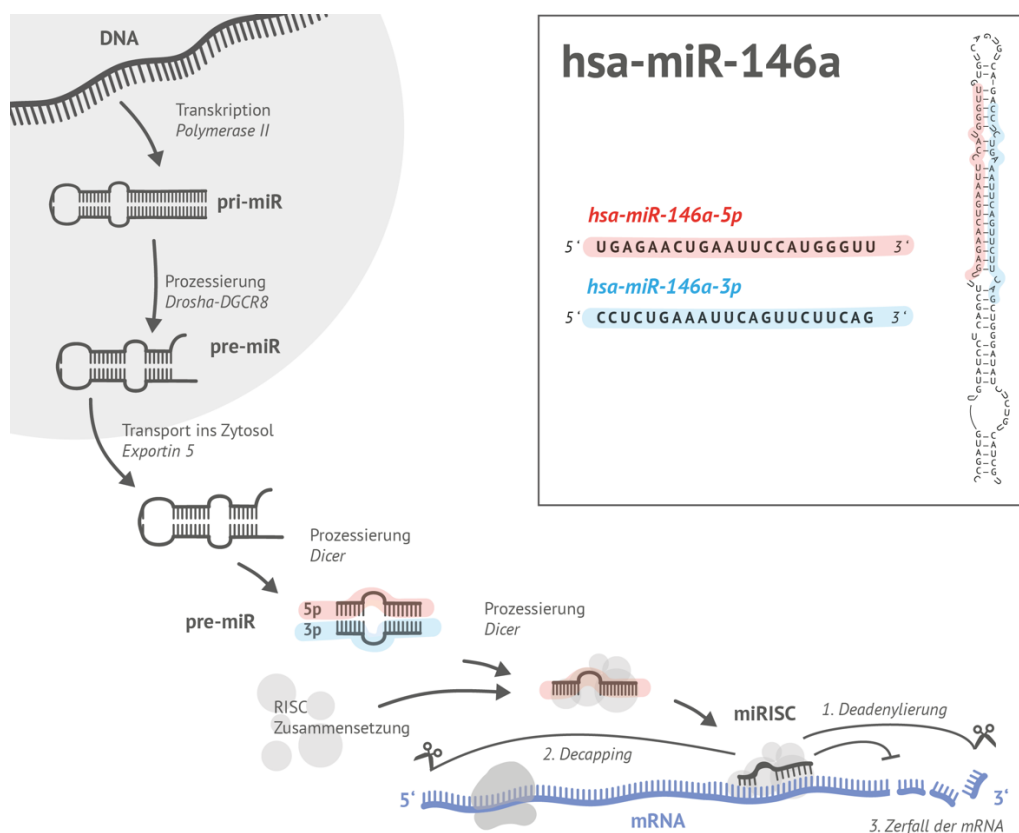


Abbildung 4: Biosynthese der miRs und miR-Sequenz am Beispiel von miR-146a (basierend auf Ha und Kim (2014)).

60 % der humanen Gene besitzen mindestens eine miR-Bindungsstelle. Diese Bindungsstelle liegt üblicherweise in der 3' *untranslated region* (3' UTR) der mRNA. Obwohl die Bindung an die mRNA klassischerweise im 3' UTR Bereich stattfindet, ist sie nach heutigen Kenntnissen auch im 5' UTR und im translatierten Bereich der mRNA möglich (De Lucia et al. 2017). Die Bindung des miRISC an einer mRNA führt im Anschluss immer zur Degradation der mRNA. Dies verhindert die Translation zu einem Gen und hemmt damit indirekt die Genexpression. Die Degradation erfolgt über eine Deadenylierung am 3' Ende, *Decapping* am 5' Ende und den anschließenden Zerfall der mRNA (Jonas und Izaurralde 2015). (Abbildung 4)

Die Basenpaarung zwischen miR und mRNA muss nicht perfekt komplementär erfolgen. Es wird geschätzt, dass auf diese Weise eine miR mehrere hunderte verschiedene mRNAs regulieren kann (Betel et al. 2008; Krek et al. 2005). Dadurch entsteht die Möglichkeit, dass eine miR ganze Gennetzwerke und simultan mehrere Signalwege und biologische Prozesse beeinflussen kann. Dies eröffnet zwei unterschiedliche Strategien für den Einsatz neu gewonnener Erkenntnisse über einzelne miRs im klinischen Alltag: zum einen den Einsatz in der Diagnostik über die Bestimmung der miRs als Marker für bestimmte Erkrankungen und zum anderen den Einsatz als Therapeutikum mithilfe von *Mimics* und Antagomirs (De Lucia et al. 2017).

Ein Beispiel für miRs in der Diagnostik stellt die Studie von Corsten et al. (2010) dar. Bei Patient:innen mit unterschiedlichen kardialen Erkrankungen, wie Myokardinfarkt oder akuter Herzinsuffizienz wurden Blutproben nach erhöhten miR-Leveln untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Untergang von Herzgewebe zu einer im Blut messbaren Freisetzung von miR-208b und miR-499 führt, die beide speziell in Herzmuskelzellen vorkommen. Die Bestimmung dieser miRs im Blut könnte in Zukunft dabei helfen, einen Myokardschaden frühzeitig zu erkennen und therapeutische Maßnahmen zeitnah einzuleiten.

Beim Einsatz der miR als Therapeutikum kämen zum einen miR-*Mimics* in Frage, die eine miR imitieren und ebenfalls die Translation bestimmter mRNAs vermindern und zum anderen AntimiRs, die vorkommende miRs binden und somit deren Wirkung inhibieren. Je nachdem ob ein miR-Level pathologisch erhöht oder erniedrigt ist, können entweder miR-*Mimics* oder AntimiRs eingesetzt werden (Krützfeldt et al. 2005; Martinez et al. 2002).

Ein erfolgsversprechendes Beispiel für den Einsatz einer AntimiR als Therapeutikum stellt die Studie zu miravirsen® in der Hepatitis-C-Virus-Therapie dar. Das sogenannte miravirsen® ist ein Oligonukleotidstrang, der miR-122 binden und damit hemmen kann. MiR-122 kommt im Lebergewebe vor und ist essentiell für die Stabilität und Vermehrung des Hepatitis-C-Virus. Das Therapeutikum hat bereits die Phase II der klinischen Studie abgeschlossen. Dabei war das Mittel subkutan bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion injiziert worden. Es konnte zum einen eine Reduktion der Viruslast nachgewiesen werden, zum anderen zeigten sich nach dieser kurzfristigen, fünfwöchigen Anwendung keine

negativen Auswirkungen auf andere Organsysteme (Janssen et al. 2013; Van Rooij et al. 2012).

Unmittelbar nach ihrer Entdeckung wurde bereits das therapeutische Potential der nicht-kodierenden RNAs erkannt und erforscht. Die Regulation von Genen durch miRs stellt im Gegensatz zur traditionellen Gentherapie ein vielversprechendes Feld neuartiger Interventionen dar.

Die altersbedingte arterielle Gefäßversteifung wird durch unterschiedliche Mechanismen, wie Elastinfragmentation, gesteigerte Kollagensynthese, vaskuläre Kalzifikation oder Zellseneszenz verursacht (Lyle und Raaz 2017). Damit wird die Pathogenese potentiell von einigen hunderten Genen beeinflusst. Es konnten bereits zahlreiche miRs beschrieben werden, die bei jeweils einem dieser Mechanismen beteiligt sind (Nanoudis et al. 2017). MiRs können allerdings auch ganze Gennetzwerke regulieren. Demzufolge könnte es eine einzelne miR geben, die alle diese Mechanismen reguliert. Eine solche miR käme für die Therapie der arteriellen Gefäßversteifung in Frage, konnte bisher allerdings noch nicht beschrieben werden.

1.2.2 MiR-146a in Physiologie und Pathologie

Thema der vorliegenden Arbeit war der Einfluss von miR-146a auf die Entstehung der arteriellen Gefäßversteifung. Daher werden im Folgenden die Eigenschaften von miR-146a näher erläutert. MiR-146a wurde erstmals im Herzgewebe von Mäusen identifiziert (Lagos-Quintana et al. 2002). (vgl. Abbildung 4) Die bisher publizierte Forschung befasst sich zu einem Großteil mit der Rolle von miR-146a im Kontext von immunologischen Prozessen.

In humanen Zellen wurde miR-146a erstmals von Taganov et al. (2006) beschrieben. Sie zeigten, dass miR-146a nach Stimulation von Monozyten mit mikrobiellen Stoffen, wie bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS), und proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin-1 β , massiv hochreguliert wird. Diese Reaktion war dabei zudem abhängig von *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der insbesondere bei inflammatorischen Prozessen vermehrt ausgeschüttet wird (Ghosh et al. 1998). Die Studie von Taganov et al. (2006) beschreibt außerdem erstmals *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1* (*IRAK1*) und *TNF receptor associated factor 6* (*TRAF6*) als Zielgene von miR-146a. Beide Gene sind Teil der *toll like receptor*(TLR)-Signalkaskade, welche die Immunantwort des Körpers auf bakterielle Endotoxine, wie LPS, reguliert. Weiterführende Studien konnten im Zellmodell zeigen, dass miR-146a in die Immunantwort über die TLR/*tumor necrosis factor*(TNF)-Kaskade involviert ist und eine Hemmung von miR-146a zu einer verstärkten Immunantwort auf Endotoxine führt (El Gazzar et al. 2011; Nahid et al. 2011). *IRAK1* ist eins der am längsten untersuchten Zielgene von miR-146a und kann daher in Experimenten, die eine miR-146a-abhängige Regulation von Genen untersuchen, als Kontrollgen herangezogen werden.

Auch im Bereich der kardiovaskulären Forschung wurde die Rolle von miR-146a näher untersucht, wie eine Studie zu sepsisinduzierter Herzinsuffizienz zeigt. Dem Krankheitsbild der Sepsis liegen generalisierte Inflammationsgeschehen zugrunde. Die Studie von Gao et al. (2015) untersuchte im Mausmodell, welchen Einfluss eine Transfektion von miR-146a auf die Inflammationsmechanismen und die Herzfunktion hat. MiR-146a konnte dabei die Inflammation in den Herzmuskelzellen reduzieren und wirkte somit protektiv auf die Entstehung von sepsisinduzierter Herzinsuffizienz. Die Analyse von miR-Expressionen in humanen, atherosklerotischen Plaques im Rahmen der *Tempere Vascular Study* ergab unter anderem auch erhöhte Level von miR-146a im Vergleich zu nicht sklerotisch veränderten Gefäßen (Raitoharju et al. 2011). Diese beiden Studien deuten darauf hin, dass miR-146a Entzündungsreaktionen in Gefäßen beeinflusst. Inflammation ist zudem einer der Pathomechanismen von arterieller Gefäßversteifung.

Auch im Kontext der arteriellen Gefäßversteifung wurde miR-146a bereits untersucht. Rezvan et al. (2014) untersuchten Blutproben von 39 Patienten. Zunächst war durch die Messung der Pulswellengeschwindigkeit die arterielle Gefäßsteifigkeit bestimmt worden. Anschließend wurde das Level an zirkulierender miR-146a in den Blutproben analysiert. Dabei lag miR-146a vermehrt bei Patienten mit arterieller Gefäßversteifung im Vergleich zu gesunden Patienten erhöht vor.

Hinsichtlich der zugrundeliegenden gesteigerten Kollagensynthese liefert die Studie von Zou et al. (2017) neue Erkenntnisse. Sie konnten im Zellmodell zeigen, dass miR-146a die Entstehung von Leberfibrose über den TGF- β 1/SMAD3-Signalweg und den LPS/NF- κ B-Signalweg vermindert. Möglicherweise lassen sich diese Ergebnisse auch im Rahmen der vaskulären Fibrose reproduzieren. Studien, die dies genauer untersuchen, fehlen hingegen noch. Weiterhin ist *SMAD4* bereits vor einigen Jahren als Zielgen von miR-146a identifiziert worden (Jin et al. 2014; Li J et al. 2012; Li W et al. 2013; Liu et al. 2012; Xiao et al. 2012). Erst kürzlich konnten Qiu M et al. (2020) zudem zeigen, dass auch *SMAD3* ein Zielgen von miR-146a ist. Damit ist eine Regulation von *SMAD3* über miR-146a bereits bekannt. Es gibt allerdings noch keine Untersuchungen zur miR-146a-abhängigen Regulation von *SMAD3* im Rahmen der arteriellen Gefäßversteifung.

Weiterhin gibt es noch keine Studien zum Einfluss von miR-146a auf die Kollagen-*Crosslinks* vom HP-Typ, die in fibrotischem Gewebe vermehrt vorkommen. Das Enzym LH2 katalysiert die Hydroxylierung von Lysinresten, welche anschließend anstelle des Allysins über den Hydroxyallysin-Weg zu HP werden. Auch Studien zur Aktivität der LH2 im Hinblick auf die gesteigerte Kollagensynthese im Rahmen der arteriellen Gefäßversteifung fehlen bisher.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die altersbedingte arterielle Gefäßversteifung stellt sowohl ein schwerwiegendes Krankheitsbild des Herz-Kreislauf-Systems sowie einen eigenen Risikofaktor für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen dar (O'Rourke und Hashimoto 2007; Safar und Lacolley 2007). Die zugrunde liegenden pathologischen Mechanismen sind Gegenstand aktueller Forschung (DuPont JJ et al. 2019). Besonders Veränderungen in der Extrazellulärmatrix der Aorta durch gesteigerte Kollagensynthese oder vermehrte Elastinfragmentation spielen dabei eine Rolle (O'Rourke und Hashimoto 2007; Wang M et al. 2007). Es gibt Hinweise, dass ein erhöhtes TGF- β 1/SMAD3-*Signaling* vaskuläre Fibrose auslösen kann (Wang M et al. 2007; Wang W et al. 2006). Weiterhin konnten Kollagen-*Crosslinks* vom HP-Typ vermehrt in fibrotischem Gewebe nachgewiesen werden (Last et al. 1990; Uzawa et al. 1998).

MiRs sind post-transkriptionelle Regulatoren, die ganze Gennetzwerke regulieren können (Betel et al. 2008; Krek et al. 2005). MiR-146a ist bereits als protektiver Regulator von inflammatorischen und fibrogenen Prozessen beschrieben worden (El Gazzar et al. 2011; Nahid et al. 2011; Zou et al. 2017). Weiterhin konnte miR-146a bei Patient:innen mit erhöhter arterieller Gefäßversteifung vermehrt im Blut gemessen werden (Rezvan et al. 2014). Studien über die Auslöser dazu liegen noch nicht vor. Ebenso gibt es noch keine Untersuchungen zum Einfluss von miR-146a auf die gesteigerte Kollagensynthese und vaskuläre Fibrose im Rahmen der arteriellen Gefäßversteifung. *SMAD3* ist bereits als Zielgen von miR-146a beschrieben worden (Qiu M et al. 2020). Ebenfalls konnte bereits gezeigt werden, dass SMAD3 als Transkriptionsfaktor für das Gen *PLOD2* fungiert, welches für die Entstehung HP entscheidend ist (Gjaltema et al. 2015). Beide Gene wurden allerdings bisher noch nicht im Rahmen der arteriellen Gefäßversteifung untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von miR-146a auf den Mechanismus der gesteigerten Kollagensynthese im Rahmen der altersbedingten arteriellen Gefäßversteifung zu untersuchen. Dabei lagen folgende Hypothesen zugrunde, welche mithilfe der Analyse von gealterten murinen Aorten und unterschiedlicher *In-vitro*-Experimente überprüft wurden: miR-146a ist in gealterten, steifen murinen Aorten hochreguliert (Hypothese 1, H1). MiR-146a wird dabei in Abhängigkeit der Matrixsteifigkeit differentiell exprimiert (H2). Weiterhin reguliert miR-146a die profibrotischen Gene *SMAD3* und *PLOD2* und agiert somit als negativer Regulator auf den Vorgang der vaskulären Fibrose (H3). Diese Regulation von *PLOD2* geschieht in Abhängigkeit von SMAD3, einem bekannten Transkriptionsfaktor von *PLOD2* (H4). MiR-146a hemmt außerdem die Synthese von Kollagenmolekülen (H5).

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Tabelle 1: Zellen

HAoSMC – Human Aortic Smooth Muscle Cells Katalognummer CC-2571, Lot Nummer 0000369150, Alter 43, männlich, Ethnie C	LONZA (Basel, Schweiz)
--	------------------------

Tabelle 2: Medien

Clonetics® SmGM-2® Smooth Muscle Growth Medium-2 SmBM® 500 ml Insulin 0,5 ml hFGF-B 1 ml FBS 25 ml (5 %) hEGF 0,5 ml	LONZA (Basel, Schweiz)
DMEM (1X) Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose (4,5 g/l)	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
DMEM (1X) Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose (4,5 g/l) mit 0,5 % Serum DMEM 500 ml FBS 2,5 ml	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
DMEM (1X) Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose (4,5 g/l) mit 10 % Serum DMEM 500 ml FBS 50 ml	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
OPTI-MEM® I (1X) Reduced Serum Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Recovery™ Cell Culture Freezing Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

PBS PBS Tabletten (2 Stück) Milli-Q Water (1 l)	
0,25 % Triton X Puffer 125 µl Triton X 49,875 ml PBS	

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Aqua ad iniectabilia	Braun (Melsungen, Deutschland)
Rinderserumalbumin, BSA, Bovine Serum Albumin (100X)	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)
Chloroform, für Analysen, CAS 67-66-3	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Clonetics® Trypsin Neutralizing Solution (TNS)	LONZA (Basel, Schweiz)
Clonetics® Trypsin/EDTA	LONZA (Basel, Schweiz)

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

Dextransulfat-Natriumsalz, aus <i>Leuconostoc</i> spp. > 500.000 Da	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DPBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1X), ohne Calcium, ohne Magnesium	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Ethanol absolut, für Analysen, CAS Nr.: 64-17-5	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Fetales Rinderserum, FBS, Fetal Bovin Serum	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Hoechst 33342 (20 mM)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Isopropylalkohol, zur Analyse EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur CAS-Nr.: 67-63-0	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
L-Ascorbinsäure-2-phosphat-Sesquimagnesiumsalz-Hydrat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Lipofectamine® RNAiMAX	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
OptiCol™ Human Collagen Type I	Cell Guidance Systems (Cambridge, Großbritannien)
Paraformaldehyde (PFA) 4 %, in PBS 11,0	Labortechnik Süssle (Gudensberg, Deutschland)
PBS (Phosphate Buffered Saline) Tabletten	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
QIAzol® Lysis Reagent	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Salzsäure, 36,5-38,0 %	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA)
TGF-β1 (transforming growth factor beta 1), recombinant human, HEK293-derived	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Triton® X-100	Fluka, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sea Block Buffer, ab166951	abcam (Cambridge, Großbritannien)
Vectashield® Eindeckmedium für Fluoreszenz	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)

Tabelle 6: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

miRNAasy Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Super Script® VILO™ Master Mix	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
TaqMan® Universal Master Mix II	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
TaqMan™ MicroRNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tabelle 7: Primer

TaqMan® 18S rRNA (20X)	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
TaqMan® Gene Expression <i>Assays</i>	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tabelle 8: Antikörper

Polyklonaler Goat Anti-Rabbit IgG Antikörper (Alexa Flour® 647), ab150079	abcam (Cambridge, Großbritannien)
Polyklonaler Kollagen I Antikörper, Rabbit/IgG, PA5-29569	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tabelle 9: Modulatoren

mirVana™, miRNA inhibitor hsa-miR-146a-5p, ID: MH10722	Ambion, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
mirVana™, miRNA mimic, hsa-miR-146a-5p, ID: MC10722	Ambion, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
mirVana™, miRNA mimic, Negative Control #1	Ambion, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Silencer®, Negative control #1	Ambion, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Silencer®, SMAD3 siRNA, ID: 22715	Ambion, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

10ml Zellkulturplatten: TC-Schale 100, Cell+	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
CytoOne 6-well Zellkulturplatten	Star Lab (Hamburg, Deutschland)
Deckgläser 24 x 60 mm, Stärke 1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Falkon-Röhren 15 ml, 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
MicroAmp® Optical 384-well Reaction Plate	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Nalgene™ Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Nunc™ LabTek™ II Chamber Slide™ System, Objektträger mit Polystyrol Medienkammern, Größe: 4-well	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
PCR Tubes, 0,2 ml, 8-Strip, flat cap	Star Lab (Hamburg, Deutschland)
qPCR Seal, Versiegelungsfolie	4titude (Wotton, Großbritannien)
Safe Lock Eppendorf-Cups 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Safe Seal SurPhob Filterspitzen, verschiedene Größen	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien

Serologische Pipette 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Softwell® Easy coat hydrogels, 6-well Plate, 25 kPa und 0,5 kPa	Matrigen Life Technologies (Brea, CA, USA)
Steriflip® Vacuum Filtrationssystem, Membran 0,22 µm, 50 ml	Millipore (Billerica, MA, USA)
T75 Zellkulturflaschen: TC-Flasche T75, Stand., Bel. Ka.	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellschaber, 25 cm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Tabelle 12: Geräte

Accu-jet® pro Pipettierhilfe	Brand (Wertheim, Deutschland)
CO ₂ Incubator HERACell Vios 160i	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Eppendorf Zentrifuge 5418R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Fast Real-Time PCR System, 7900HT	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Fluoreszenzmikroskopsystem Observer. Z1 Mikroskop AxioCam MRm Kamera X-Cite Series 120 EXFO Lichtquelle	Carl Zeiss (Jena, Deutschland) Carl Zeiss (Jena, Deutschland) Excelitas Inc. (Mississauga, ON, Canada)
Gefrierschrank -86 °C, MDF-DU700VH-PE VIP ECO ULT Freezer	Panasonic (Tokio, Japan)
Fisherbrand™ Labor-Homogenisator Modell 500	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Neubauer Zählkammer	Laboroptik LO (Lancing, Großbritannien)
Präzisionswaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Primo Vert Mikroskop	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Sicherheitswerkbank	Clean Air (Hilden, Deutschland)
Sprout® Mini-Zentrifuge	Heathrow Scientific (Vernon Hills, IL, USA)
T100™ Thermal Cycler	Bio Rad (Hercules, CA, USA)
Transferringpipette® S, 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl und 2,5 µl	Brand (Wertheim, Deutschland)
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc. (Bohemia, NY, USA)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 13: Software

AxioVision Rel.4.8.2.Sp3 (08/2013)	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Prism 7 for Mac OS X Version 7.0a, April, 2016	GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)
ImageJ 1.52a, 2018	National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)
Microsoft Word, Version 16.47	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft Excel, Version 16.47	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
NanoDrop™ 2000 operating software, Version 1.6	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
SDS 2.4, 7900HT Fast Real-Time PCR System Software	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

2.2 Murine Aorten

Die analysierten murinen Aorten stammten von vorherigen Projekten der Arbeitsgruppe. Die Tierhaltung, Tötung und Organentnahme war bereits durch Arbeitsgruppenmitglieder erfolgt. Die entnommenen Aorten waren in geeigneten Eppendorf-Cups sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert worden.

2.3 Zellen

Die Experimente wurden mit humanen glatten Gefäßmuskelzellen aus der Aorta, sogenannten *human aortic smooth muscle cells* (HAoSMCs), durchgeführt. Diese wurden kommerziell über die Firma LONZA erworben. Zellen von LONZA werden von humanen Spendern isoliert, bei einer Zellpassage von drei eingefroren und verschickt. Zuvor werden die Zellen nach einem Qualitätsstandard der Firma LONZA mikrobiologisch getestet und deren Zelleistung bestimmt. Die Spender sind im beigefügten Datenblatt gut charakterisiert nach Alter, Geschlecht und Ethnie. (Abschnitt 6.1)

Die humanen Zellen wurden nur bis zu einer zuvor im Labor festgelegten Zellpassage verwendet. Die Anzahl der Zellpassagen gibt an, wie oft bereits Subkulturen erstellt wurden. Für diese Arbeit wurden keine Zellen mit einer Zellpassage über 15 verwendet, da Alterung einen wichtigen Einflussfaktor darstellte.

2.4 *In-vitro*-Arbeit

2.4.1 Allgemeine Zellkulturarbeit

Als Basismedium für das Wachstum der Zellen wurde *smooth muscle growth medium 2* (SmGM-2) verwendet. Dieses besteht aus Basismedium (*smooth muscle basal medium*, SmBM),

dem zur Versorgung mit Wachstumsfaktoren die mitgelieferten Zusätze zugefügt wurden. Dies waren pro 500 ml SmBM 25 ml *fetal bovine serum* (FBS), 5 %, 1 ml *human fibroblastic growth factor B* (hFGF-B), 0,5 ml Insulin und 0,5 ml *human epidermal growth factor* (hEGF). Das mitgelieferte Gentamicin wurde nicht zugefügt, da die Zellen grundsätzlich ohne Antibiotikum kultiviert wurden. Aufbewahrt wurden die Zellkulturen in T75 Zellkulturflaschen oder 10 ml Zellkulturplatten, bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator. Gearbeitet wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank.

Zur Herstellung von Subkulturen wurden Platten mit einer Konfluenz von mindestens 60 % bis maximal 95 % auf mehrere neue Platten aufgeteilt. Dazu wurde das alte Wachstumsmedium entfernt und mit *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) gründlich gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA) hinzugegeben und dann für circa fünf Minuten im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um die Zellen vom Boden der Platte zu lösen. Nach visueller Kontrolle der Adhäsion unter dem Lichtmikroskop wurde die Reaktion mit 3 ml *trypsin neutralizing solution* (TNS) gestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 1000 *revolutions per minute* (rpm) für fünf Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Der Zellpellet wurde anschließend mit frischem Wachstumsmedium suspendiert, auf die neuen Platten aufgeteilt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Um die Zellen für längere Zeit aufzubewahren, wurden sie bis auf -196 °C heruntergefroren. Dazu wurden sie wie beim Splitten von den Platten gelöst und in einen Zellpellet zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 1000 µl Gefriermedium suspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden anschließend für zwei Stunden bei -20 °C eingefroren, danach für 24 Stunden bei -80 °C und dann für die gewünschte Zeit in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Dieses Vorgehen diente dazu, die Zellen behutsam und schonend auf die für langfristige Lagerung benötigte Temperatur herunterzufrieren.

Um die Zellen wieder aufzutauen und in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen für ungefähr zwei Minuten in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten und anschließend auf eine Platte mit bereits vorbereitetem Wachstumsmedium gegeben. Dann wurden die Zellen wieder bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Nährmedium gewechselt, um die Reste des Gefriermediums zu entfernen.

2.4.2 Ausplattieren

Für die Durchführung von Experimenten wurden die Zellen auf die benötigten Zellkulturplatten und Objektträger überführt und dazu wie oben beschrieben von den 10 ml Zellkulturschalen gelöst und in ein Zellpellet zentrifugiert. Anschließend wurde der Pellet in frischem Zellkulturmedium gelöst und dann mit einer Neubauer Zählkammer die Anzahl an Zellen pro Milliliter bestimmt. Die benötigte Anzahl an Zellen wurde dann verdünnt in frischem Zellkulturmedium auf die benötigten Platten verteilt.

Für die Genexpressionsanalysen, bei denen HAoSMCs mit miR-146a-Modulatoren transfiziert wurden, wurden dafür 6-Kammer-Platten mit $1,5 \cdot 10^5$ Zellen pro 2 ml Medium und Kammer verwendet. Für die Genexpressionsanalysen in Abhängigkeit der Matrixsteifigkeit wurden allerdings speziell beschichtete weichere 6-Kammer-Platten verwendet, sogenannte *Softwell*TM-Platten und für das *Scar-in-a-jar* Experiment wurde das *Chamber Slide*TM-Objektträger-System verwendet.

2.4.2.1 *Softwell*TM-Platten

Herkömmliche Zellkulturplatten aus Polystyrol haben ein Elastizitätsmodul von ca. 10^6 kPa (Callister Jr. und Rethwisch 2007). Für die Experimente, bei denen die Regulation von miR-146a in HAoSMCs in Abhängigkeit der umgebenen Matrixsteifigkeit untersucht wurde, wurden mit Polyacrylamid beschichtete Zellkulturplatten verwendet, die unterschiedliche Elastizitätsmoduli aufwiesen und dadurch unterschiedlich steif waren. Diese *Softwell*TM Platten wurden mit den Elastizitätsmoduli 0,5 kPa und 25 kPa bei der Firma Matrigen erworben.

Da die HAoSMCs auf den *Softwell*TM-Platten weniger adhärent wuchsen als auf den normalen Zellkulturplatten, war eine spezielle Beschichtung aller Platten in diesem experimentellen Aufbau nötig, um die benötigte Menge an Zellen für die molekularen Untersuchungen ernten zu können. Dazu wurde eine Beschichtung mit Kollagen I etabliert. Nach der Beschichtung mit Kollagen wurden die Zellen in einer Dichte von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen pro 3 ml Medium und Kammer ausplattiert.

2.4.2.2 Kollagenbeschichtung

Bei einem Vorversuch wurde zunächst die Konzentration an Kollagen ermittelt, die noch ausreichend war, um die Zellen adhärent an den *Softwell*TM-Platten wachsen zu lassen. Dazu wurde eine Platte mit einem Elastizitätsmodul von 0,5 kPa mit unterschiedlichen Konzentrationen von humanem Kollagen I beschichtet und im Anschluss $3 \cdot 10^5$ Zellen pro 2 ml ausplattiert und für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die optimale Kollagenkonzentration von 5 µg/ml optisch mithilfe von lichtmikroskopischen Bildern ermittelt. (Abbildung 5) Daraus ergab sich für die Kollagenbeschichtung vor dem Ausplattieren auf die *Softwell*TM-Platten folgendes Protokoll:

Das humane Kollagen I (3,1 µg/µl) wurde zunächst in DPBS zu einer Konzentration von 5 µg/ml verdünnt und gemischt bis sich alles aufgelöst hatte. In jede Kammer der 6-Kammer-Platte wurde anschließend 1 ml der Lösung gegeben und durch Schwenken der Platte so verteilt, dass der gesamte Boden der Kammer bedeckt war. Die Platte wurde dann für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Kollagenlösung aspiriert und die Kammer behutsam mit 1 ml DPBS gespült, ohne dabei die Oberfläche der Beschichtung zu berühren. Danach waren die Platten bereit für das Ausplattieren der Zellen.

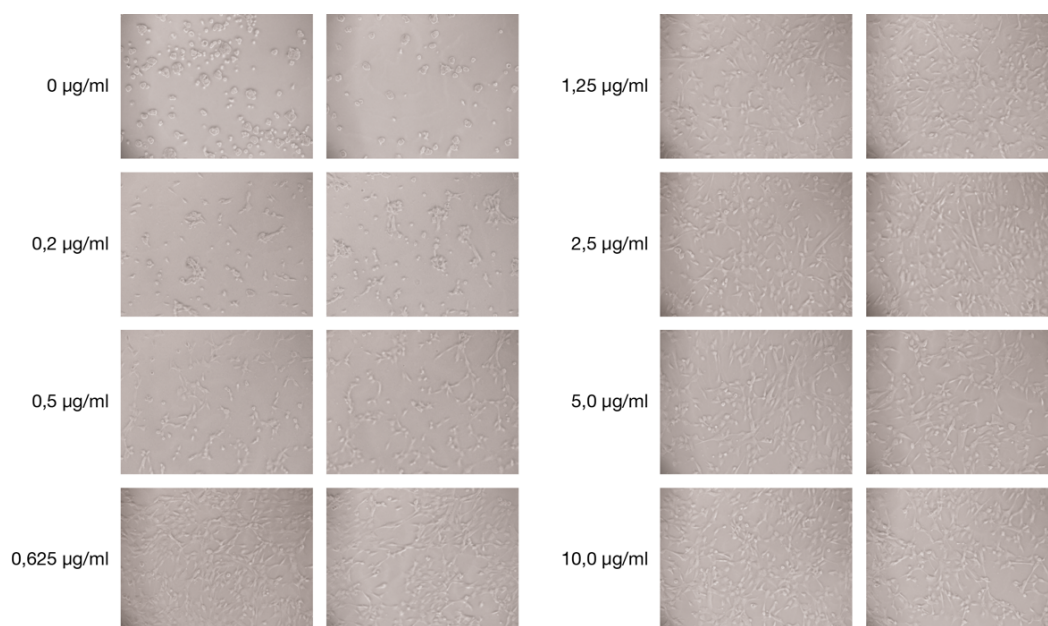


Abbildung 5: **Etablierung der Kollagenbeschichtung.** Gezeigt sind je zwei lichtmikroskopische Bilder aus der gleichen Kammer für insgesamt 8 verschiedene Konzentrationen von humanem Kollagen I (0 µg/ml bis 10 µg/ml).

2.4.2.3 Chamber Slide™-System

Für das *Scar-in-a-jar Assay* wurde ein System benötigt, bei dem alle Abschnitte des Versuchsprotokolls, von der Arbeit in Zellkultur bis zur immunhistochemischen Färbung, in einer Kammer durchgeführt werden konnten, um kein synthetisiertes Kollagen für die Messung zu verlieren. Dazu wurde das Chamber Slide™-System verwendet. Dieses besteht aus Objektträgern, deren Oberfläche für die Zellkulturarbeit beschichtet und mit einer abnehmbaren Polystyrol-Medienkammer versehen sind. In der vorliegenden Arbeit wurde das 4-Kammer-System verwendet, bei dem vier Kammern pro Objektträger aufgebracht sind, was einer Fläche von 1,7 cm² pro Kammer entspricht und damit mit einer regulären 24-Kammer-Platte vergleichbar ist. Für das Experiment wurden in jede Kammer nach dem oben beschriebenen Vorgehen $0,6 \cdot 10^5$ Zellen in 1 ml *Dulbecco's modified eagle's medium* mit 10 % Serumzugabe (10 % DMEM) je Kammer ausplattiert.

2.4.3 Ernten

Am Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen mit Phenol und Guanidin basiertem *QLAzol Lysis Reagent* für die weitere molekulare Analyse geerntet. Dazu wurde das Zellmedium abgenommen und 700 µl Reagenz in jede Kammer gegeben. Mithilfe eines Zellschabers wurde die Zellschicht in die Flüssigkeit gelöst. Beim Ernten von den *Softwell™*-Platten wurde dabei äußerst behutsam vorgegangen, damit nur die Zellen in die Suspension gelangten und die Kollagenbeschichtung nicht versehentlich abgelöst wurde. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Zellen des *Scar-in-a-jar Assays* wurden als einzige Zellen nicht auf die oben beschriebene Weise geerntet, sondern immunhistochemisch gefärbt. (Abschnitt 2.6.1)

2.4.4 Transfektion

Zur Analyse der Regulation unterschiedlicher Gene durch miR-146a wurden die HAOsMCs mit miR-146a-Modulatoren transfiziert. Diese Modulatoren konnten die Aktivität von miR-146a spezifisch hoch- oder herunterregulieren.

2.4.4.1 Transfektion der miR-146a-Modulatoren

Bei den speziellen miR-146a-Modulatoren handelte es sich um miR-146a-*Mimics* und miR-146a-Inhibitoren. Die *Mimics* sind kleine, chemisch modifizierte, doppelsträngige RNAs, die die Funktion von miRs imitieren und somit die Aktivität der miR-146a spezifisch hochregulieren können. Die Inhibitoren sind kleine, chemisch modifizierte, einzelsträngige RNAs, die miR-146a binden und somit die Aktivität der miRs hemmen. Die negative Kontrolle bestand aus einer zufälligen Sequenz, die keinen Einfluss auf die mRNA Aktivität hat.

Direkt vor der Transfektion wurde das Wachstumsmedium zu frischem SmGM-2 gewechselt. Anschließend wurden sowohl die Trägerreagenz Lipofektamin (RNAiMAX) als auch die miR-Modulatoren in *optimal minimal essential medium* (Opti-MEM) verdünnt. 7,5 µl Lipofektamin wurden in 100 µl Opti-MEM pro Kammer angesetzt. Gleichzeitig wurden 100 pmol miR-146a-Inhibitor, 100 pmol miR-146a-*Mimic* und 100 pmol der negativen Kontrolle in je 100µl Opti-MEM pro Kammer verdünnt. Beide Reagenzien wurden anschließend 1:1 gemischt und nach fünf Minuten Inkubation wurden je 200 µl des Komplexes in jede Kammer gegeben. Die Platten inkubierten anschließend für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.4.4.2 Transfektion der *SMAD3* siRNA

Die Transfektion zur Untersuchung der SMAD3-abhängigen Regulation des Gens *PLOD2* erfolgte mithilfe einer zusätzlichen Transfektion. Bevor wie oben bereits beschrieben die miR-Modulatoren miR-146a-*Mimic*, miR-146a-Inhibitor und die negative Kontrolle transfiziert wurden, wurden die HAOsMCs mit *small interfering RNA* (siRNA) für *SMAD3* transfiziert. SiRNAs sind kurze interferierende RNAs, mit denen man das interkalierende Gen in einer Zelle ausschalten kann.

Vor der ersten Transfektion mit siRNA und negativer Kontrolle wurde das Wachstumsmedium für eine halbe Stunde zu frischem Opti-MEM gewechselt. Pro Kammer wurden anschließend 7,5 µl Lipofektamin (2000) und 100 pmol siRNA beziehungsweise 100 pmol negative Kontrolle in je 100 µl Opti-MEM verdünnt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden beide Komponenten 1:1 gemischt und nochmals für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Hälfte der Kammern wurde mit jeweils 200 µl siRNA

Komplex und die andere Hälfte mit jeweils 200 µl Kontrollkomplex behandelt. Der Zeitpunkt dieser ersten Transfektion wird im Folgenden als Zeitpunkt 1 bezeichnet. Nach vier Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium zu frischem SmGM-2 Medium gewechselt, um das Lipofektamin zu entfernen und die HAoSMCs für weitere 20 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der miR-Modulatoren nach dem gleichen Protokoll wie am Vortag. Dazu wurden diesmal pro Kammer 7,5 µl Lipofektamin (2000) und jeweils 100 pmol der einzelnen miR-146a-Modulatoren (*Mimic* und Inhibitor) und der negativen Kontrolle in je 100 µl Opti-MEM verdünnt und nach 15 Minuten Inkubation auf Eis 1:1 gemischt. Nach weiteren fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde jeweils 200 µl des Komplexes in die entsprechenden Kammern gegeben. Der Zeitpunkt dieser zweiten Transfektion wird im Folgenden Zeitpunkt 2 genannt und fand genau 24 Stunden nach Zeitpunkt 1 statt. Nach vier Stunden erfolgte wieder ein Mediumwechsel, um das Lipofektamin zu entfernen und die Zellen wurden im Anschluss nochmal für 44 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.4.4.3 Transfektion für *Scar-in-a-jar*

Auch für das *Scar-in-a-jar Assay* wurden die ausplattierten HAoSMCs zunächst mit den miR-146a-Modulatoren (*Mimic* und Inhibitor) und der negativen Kontrolle transfiziert.

Zunächst wurde eine Stunde vor der Transfektion in jeder Kammer das DMEM 10 % durch 500 µl frisches Opti-MEM ersetzt. Anschließend wurden pro Kammer jeweils 1,5 µl Lipofektamin (RNAiMAX) in 25 µl Opti-MEM verdünnt. Ebenso wurden 20 pmol Modulator oder negative Kontrolle in 25 µl Opti-MEM verdünnt und beide Reagenzien für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze 1:1 gemischt und nochmals für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde in jede Kammer 50 µl des Komplexes pipettiert und die Objektträger für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.4.5 Behandlung *Scar-in-a-jar*

Die Behandlung für das *Scar-in-a-jar Assay* basierte auf den Untersuchungen von Chen et al. (2009). Zunächst wurden dafür die transfizierten HAoSMCs nach abgeschlossener Inkubationszeit für die weitere Behandlung vorbereitet. Dazu wurde das Opti-MEM in jeder Kammer zu 1 ml DMEM 0,5 % (mit 0,5 % Serumzugabe) gewechselt.

Jeder Kammer wurde dann 100 µM L-Ascorbinsäure-2-phosphat-Sesquimagnesiumsalz-Hydrat gelöst in DMEM 0 % (ohne Serumzugabe) hinzugefügt. Dieses wurde folgendermaßen vorbereitet: 10 mg L-Ascorbinsäure wurden abgewogen und in 6,91 ml DMEM 0 % zu einer 5 mM Lösung gelöst. Anschließend wurde die Lösung gefiltert, aliquotiert und für maximal einen Monat bei -20 °C gelagert (Hata und Senoo 1989).

Jede Kammer wurde außerdem mit 5 ng/ml TGF- β 1 behandelt. Dieses wurde wie vom Hersteller beschrieben gelöst und in Aliquotierungen aufbewahrt. Dafür wurde zunächst eine 4 mM Salzsäure aus 3,33 μ l 12 M Salzsäure und 10 ml H₂O hergestellt. Es wurde aus 360 μ l dieser 4 mM Salzsäure und 40 μ l *bovine serum albumin* (BSA) in einer Konzentration von 10 g/l eine 4 mM Salzsäure mit 0,1 % BSA hergestellt. Das lipophilisierte TGF- β 1 wurde anschließend aufgetaut und kurz zentrifugiert. Dann wurde es in 50 μ l 4 mM Salzsäure mit 0,1 % BSA suspendiert und für 30 Minuten inkubiert, dabei stetig bewegt. Das TGF- β 1 war nun in einer Konzentration von 100 μ g/ml gelöst. 5 μ l dieser Lösung wurden nochmals zu einer Konzentration von 2 ng/ μ l verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Dritter Bestandteil der *Scar-in-a-jar* Behandlung war Dextransulfat (DxS). Jeder Kammer wurden je 25 μ g DxS zugefügt. Dieses negativ geladene >500.000 kDa große Molekül führt zu beengten Bedingungen innerhalb der Zellkulturkammer. Damit fördert und beschleunigt es die Kollagensynthese (Lareu et al. 2007). Das DxS wurde wie folgt vorbereitet: 500 mg DxS wurden in 10 ml H₂O gelöst und anschließend gefiltert. Dies ergab eine Konzentration von 50 g/l. Diese Suspension wurde bei 4 °C gelagert und ein Teil vor jeder Verwendung auf 0,5 g/l mit H₂O verdünnt.

Im Anschluss an die Behandlung mit L-Ascorbinsäure, TGF- β 1 und DxS wurden die Objektträger nochmals für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.5 Molekulare Untersuchungen

2.5.1 RNA-Isolierung

2.5.1.1 RNA-Isolierung der murinen Aorten

Zur weiteren Analyse der murinen Aorten wurde das schockgefrostete Gewebe mit einem Homogenisierer in *QIAzol Reagent* homogenisiert und im Anschluss die RNA der Proben extrahiert. Indem man diese aus zu einem bestimmten Zeitpunkt geerntetem Gewebe oder geernteten Zellen extrahiert, ist es einem möglich, mit Verfahren wie der *real time quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR), die Aktivität der relevanten Gene an jenem Zeitpunkt zu bestimmen. Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

Die Proben wurden zunächst aus dem -80 °C Kühltank zurück in ein Gefäß mit flüssigem Stickstoff gelegt. Zu Beginn wurden sie einzeln aus dem Stickstoff genommen und je 900 μ l *QIAzol Reagent* hinzugegeben. Danach wurden die Proben pulsierend mit dem Homogenisierer zerkleinert. Dabei wurde darauf geachtet, dass sie nicht zu warm wurden, indem sie nach jeweils circa 10 s Homogenisierung für fünf bis 10 s in flüssigen Stickstoff gehalten wurden. Dieses Vorgehen wurde so lange wiederholt, bis die Proben makroskopisch frei von Gewebstückchen waren. Es wurden im Anschluss je 230 μ l Chloroform hinzugegeben und die Proben im Anschluss für 1 min stark gevortext. Dann wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für

15 min bei 4 °C in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 12.000 *relative centrifugal force* (rcf) zentrifugiert. Diese Proben waren nun in 3 Phasen aufgeteilt. Eine hydrophile Phase, mit der enthaltenen RNA, eine schmale weißliche DNA-Phase und eine hydrophobe Phase. Mithilfe einer Transferpipette wurde nun die oberste, wässrige Phase vorsichtig in einen neuen Eppendorf-Cup überführt und anschließend mit 500 µl Isopropylalkohol aufgefüllt und durch mehrmaliges Umkehren des Eppendorf-Cups vermischt. Dann wurden die Proben für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für zehn Minuten bei 4 °C und 12.000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde durch vorsichtiges, einmaliges Ausschütten abgenommen und der Zellpellet durch Zugabe von 1000 µl 75 % Ethanol gewaschen. Dazu wurde nochmal für fünf Minuten bei 4 °C und 7500 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder wie oben beschrieben ausgeleert und die offenen Eppendorf-Cups umgekehrt auf einem Papiertuch für zehn Minuten getrocknet. Am Ende wurden die RNA-Pellets in 20 µl nukleasefreiem H₂O suspendiert. Die fertig extrahierte RNA, gelöst in nukleasefreiem H₂O wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.1.2 RNA-Isolierung der Zellkulturproben

Für die weitere Analyse der in *QLAzol* geernteten Zellen musste als nächstes auch aus diesen Proben die RNA isoliert werden. Die gesamte RNA einschließlich aller siRNAs wurde dabei mit dem *miRNAasy Extraction Kit* extrahiert. Die Extraktion der siRNAs war dabei essentiell, denn so konnte auch die Aktivität von miR-146a bestimmt werden. Die Extraktion erfolgte anhand des mitgelieferten Protokolls des Herstellers:

Zunächst mussten die Proben fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Dann wurde allen Proben 140 µl Chloroform hinzugefügt und anschließend mithilfe eines Vortex Mixers 15 s stark gemischt. Im Anschluss inkubierten die Proben nochmals für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 4 °C in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 12.000 rcf zentrifugiert. Die Proben waren nun in 3 Phasen aufgeteilt. Die hydrophile Phase, mit der enthaltenen RNA, die schmale weiße DNA-Phase und die hydrophobe Phase. Mithilfe einer Transferpipette wurde nun die oberste, hydrophile Phase vorsichtig in einen neuen Eppendorf-Cup überführt und anschließend mit 150 % reinem Ethanol aufgefüllt und mithilfe der Pipette vermischt. Circa 500 µl des Ethanolgemischs wurden dann in ein spezielles, im Kit enthaltenes *collectiontube* mit integrierter Membran überführt und bei 8.000 rcf für 15 s bei 22 °C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen. Das restliche Ethanolgemisch wurde ebenfalls in die *collectiontubes* überführt und wieder bei 8.000 rcf für 15 s bei 22 °C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Nun wurden 700 µl des ersten Waschpuffers in jedes *collectiontube* gegeben und wieder bei 8.000 rcf für 15 s bei 22 °C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Dann wurden 500 µl des zweiten Waschpuffers in jedes *collectiontube* gegeben und wieder bei 8.000 rcf für 15 s bei 22 °C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Danach wurden nochmal 500 µl des zweiten Puffers in jedes *collectiontube* gegeben und diesmal bei 8.000 rcf für 2 min bei 22 °C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde

verworfen. Nun wurden die Membranen in ein frisches 2 ml *collectiontube* gestellt und bei voller Geschwindigkeit der Zentrifuge (16.900 rcf) für eine Minute bei 22 °C zentrifugiert, um die Membran vollständig zu trocknen. Danach wurden die Membranen in einen frischen 1,5 ml Eppendorf-Cup gestellt und vorsichtig 30 µl nukleasefreies H₂O auf die Membranen pipettiert, ohne dabei die Membranen mit der Pipettenspitze zu berühren. Das Ganze wurde dann für eine Minute bei 8.000 rcf und 22 °C zentrifugiert, um die RNA aus der Membran in das Wasser zu lösen. Um die RNA-Ausbeute zu erhöhen, wurde der letzte Schritt mit den 30 µl der Durchflussflüssigkeit wiederholt. Die fertig extrahierte RNA, gelöst in nukleasefreiem H₂O, wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.2 RNA-Quantifizierung

Mithilfe eines Spektralphotometers wurde die Konzentration jeder gewonnen RNA-Probe photometrisch gemessen. Dazu wurde dreimal 1 µl der jeweiligen RNA Suspension vermessen und als Referenz nukleasefreies Wasser verwendet.

Aufschluss über die Qualität der RNA gaben hierbei die Quotienten aus den Werten bei 260 nm (Absorptionsmaximum von RNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen). Reine RNA hatte hierbei einen 260/280 Quotienten von 2,0. Gleiches galt für den Quotienten aus den Wellenlängen 260 nm und 230 nm (Absorptionsmaximum von Salzen, Phenolen und anderer Verunreinigung). Waren die Quotienten deutlich niedriger als 2,0, sprach dies für eine Verunreinigung.

2.5.3 Transkription von RNA zu cDNA

Für die Analyse der extrahierten RNA mittels RT-qPCR musste die RNA zunächst zu komplementärer DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit einem cDNA-Synthese-Kit. Der darin enthaltene *MasterMix* enthielt reverse Transkriptase, Ribonuklease Inhibitor, zufällige *primer*, Magnesiumchlorid und Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs). Die RNA wurde nun nach dem folgenden Protokoll zusammen mit dem *MasterMix* in 0,2 ml Röhrchen pipettiert:

Tabelle 14: Ansatz des Reaktionsgemischs für die reverse Transkription

Reagenzien	für 1 Probe
SuperScript TM VILO TM MasterMix	4 µl
RNA	300 ng (15 ng/µl)
Nukleasefreies H ₂ O	Ad 20 µl

Im Anschluss durchliefen die Proben folgendes Programm im *Thermocycler*:

Tabelle 15: Protokoll der reversen Transkription

Temperatur	Dauer
25 °C	10 Minuten
42 °C	60 Minuten
85 °C	5 Minuten, zum Beenden der Reaktion

Danach kühlte der Block auf 4 °C runter, die Proben wurden entnommen und bei -20 °C gelagert.

2.5.3.1 Reverse Transkription von miRs

Die Synthese von cDNA aus miRs erfolgte vom Prinzip genau wie oben beschrieben, allerdings wurde ein gebrauchsfertiges Reaktionssystem verwendet, das speziell für die miRs schleifenförmige *primer* nutzt, die es der reversen Transkriptase ermöglichen, die kurzen RNA-Sequenzen zu amplifizieren.

Zunächst wurde 1 µl der RNA-Probe zu einer Konzentration von 2 ng/µl mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch angesetzt und danach mit je 5 µl der RNA und 3 µl des jeweiligen *primers* in einem 0,2ml Röhrchen gemischt:

Tabelle 16: Ansatz des Reaktionsgemischs für die reverse Transkription von miRs

Reagenzien	für 1 Probe
dNTPs, 100 nM	0,15 µl
MultiScribe RT (Reverse Transkriptase), 50 U/µl	1 µl
RT Puffer, 10X	1,5 µl
RNase Inhibitor, 20 U/µl	0,19 µl
Nukleasefreies H ₂ O	4,16 µl (ad 7 µl)
RNA Probe, 2 ng/µl	5 µl (10 ng in 5 µl)
RT- <i>primer</i>	3 µl
Volumen ohne RNA	7 µl
Volumen TOTAL	15 µl

Es wurden zwei verschiedene *primer* verwendet: ein *primer* wurde verwendet, um cDNA aus der miR-146a zu schreiben und einer, um cDNA aus der *non-coding small nuclear RNA* (snRNA) U6 zu schreiben, die als Kontroll-RNA verwendet wurde.

Tabelle 17: Verwendete *primer* für die reverse Transkription von miRs

Gen	Assay Nummer	Sequenzen
U6 snRNA	RT: 001973	Keine Sequenzinformationen verfügbar
hsa-miR-146a	RT: 00468	Keine Sequenzinformationen verfügbar

Danach durchliefen die Proben folgendes Programm im *Thermocycler*:

Tabelle 18: Protokoll der reversen Transkription von miRs

Temperatur	Dauer
16 °C	30 Minuten
42 °C	60 Minuten
85 °C	5 Minuten, zum Beenden der Reaktion

Anschließend kühlte der Block auf 4 °C runter, die Proben wurden entnommen und bei -20 °C gelagert.

2.5.4 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der *polymerase chain reaction* (PCR) ermöglicht es, gezielt kleine Stücke von DNA zu amplifizieren (Saiki et al. 1988). Die Reaktion beruht auf drei Phasen: die Denaturierung,

wobei der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen der Proben aufgebrochen wird, die Hybridisierung, bei der die *primer* (kurze DNA-Startersequenzen) sich an den Einzelstrang anlagern und die Elongation, bei der die thermostabile, bakterielle *Taq* (*Thermus aquaticus*)-Polymerase den komplementären Strang synthetisiert.

Im Anschluss hat man aus einem Doppelstrang mithilfe der spezifischen *primer* zwei vollständige kurze DNA-Doppelstränge erhalten. Dieser Zyklus wird solange wiederholt, bis ein Vielfaches der gewünschten DNA-Sequenz amplifiziert worden ist.

2.5.4.1 Prinzip der *Real-Time*-Quantifizierung

Die RT-qPCR beruht auf der herkömmlichen PCR, aber enthält im Gegensatz auch die Möglichkeit der Quantifizierung der Amplifikate. Dadurch entfällt hierbei die Quantifizierung mittels Gelelektrophorese.

Es gibt zwei Prinzipien bei der *Real-Time*-Quantifizierung. Das erste beruht auf interkalierenden DNA-Farbstoffen wie Ethidiumbromid oder SYBR® *Green*, die sich in den synthetisierten Strang einlagern. Die zunehmende Fluoreszenz korreliert daher mit der Anzahl der Amplifikate. Hierbei ist allerdings anschließend eine Schmelzkurvenanalyse nötig, um echte DNA-Doppelstränge von unspezifischen Amplifikaten zu unterscheiden.

Das zweite Prinzip beruht auf fluoreszenzmarkierten Sonden und wurde auch in dieser Arbeit angewandt. Das sogenannte *TaqMan Assay* verwendet dabei kleine Sonden, die mit zwei Fluorophoren markiert sind, dem Reporterfarbstoff und dem *Quencher*-Farbstoff. Ein Laser regt nun den Reporter mit 495 nm Exzitation an und dieser überträgt mittels Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) die Energie auf den *Quencher*. Dieser emittiert dann langwellig bei 585 nm. Die Sonde bindet anschließend an die Einzelstränge. Wenn nun der komplementäre Strang von der *Taq*-Polymerase synthetisiert wird und die Polymerase auf die Sonde trifft, wird diese verdaut und die beiden Farbstoffe werden frei. Da sie nun nicht mehr räumlich beieinander sind, kann der FRET nicht mehr stattfinden und beide Farbstoffe emittieren Fluoreszenz. Der Reporter emittiert bei 525 nm, weshalb beide Fluoreszenzsignale unterschieden werden können. Das Signal des Reporters ist proportional zur DNA-Menge.

2.5.4.2 Durchführung der *TaqMan* RT-qPCR

Mittels RT-qPCR wurde die Expression von Genen nach Kultur auf den *Softwell*TM-Platten oder nach Transfektion mit den miR-Modulatoren beziehungsweise der siRNA gemessen. Das Protokoll für die RT-qPCR von miR-146a und U6 wich hierbei von dem Protokoll für die anderen Gene ab.

Die RT-qPCR der herkömmlichen Gene wurde nach folgender Zusammensetzung für jeden *primer* pipettiert:

Tabelle 19: Ansatz des Reaktionsgemischs für die RT-qPCR

Reagenzien	für 1 Probe
PCR Puffer (2X)	5 µl
<i>Assay</i> Probe, <i>primer</i> (20X)	0,5 µl
18S, <i>primer</i> (20X)	0,5 µl
Nukleasefreies H ₂ O	3 µl
cDNA (15 ng/Kammer)	1 µl
Volumen TOTAL	10 µl

Tabelle 20: Verwendete *primer* bei der RT-qPCR

Gen	<i>Assay</i> Nummer	Sequenzen
ANKRD1	Hs00173317_m1	Keine Sequenzinformationen verfügbar
CTGF	Hs01026927_g1	Keine Sequenzinformationen verfügbar
IRAK1	Hs01018347_m1	Keine Sequenzinformationen verfügbar
PLOD2	Hs01118190_m1	Keine Sequenzinformationen verfügbar
SMAD3	Hs00969210_m1	Keine Sequenzinformationen verfügbar

Zunächst wurde der *Master-Mix* vorbereitet und anschließend wurden 9 µl davon in jede benötigte Kammer in eine 384-Kammer-Platte pipettiert. Danach wurde 1 µl der cDNA-Proben hinzugefügt. Jede Probe wurde dabei in Duplikaten pipettiert, um Pipettierfehler zu minimieren.

Die RT-qPCR für die Analyse der miRs wurde nach folgender Zusammensetzung für jeden *primer* pipettiert:

Tabelle 21: Ansatz des Reaktionsgemischs für die RT-qPCR der miRs

Reagenzien	für 1 Probe
PCR Puffer (2X)	10 µl
<i>Assay</i> Probe, <i>primer</i> (20X)	1 µl
Nukleasefreies H ₂ O	7,67 µl
cDNA (0,8867 ng/Kammer)	1,33 µl
Volumen TOTAL	20 µl

Tabelle 22: Verwendete *primer* bei der RT-qPCR der miRs

Gen	<i>Assay</i> Nummer	Sequenzen
U6 snRNA	TM: 001973	Keine Sequenzinformationen verfügbar
hsa-miR-146a	TM: 00468	Keine Sequenzinformationen verfügbar

Der vorbereitete *Master-Mix* wurde in 0,2 ml *tubes* zu je 84 µl aliquotiert und jeweils 6 µl der cDNA-Proben hinzugefügt. Dieser *Reaction Mix* wurde dann zu je 20 µl in 4 Kammern einer 384-Kammer-Platte aliquotiert. Durch das Pipettieren von Quadruplikaten jeder Probe wurden Pipettierfehler vermieden.

Anschließend wurden beide Platten jeweils mit einer Versiegelungsfolie verschlossen und bei 1500 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Danach durchlief die jeweilige Platte folgendes Programm im *Fast Real-Time* PCR System:

Tabelle 23: Protokoll der RT-qPCR

Schritt	Dauer	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initialisierung	10 Minuten	95 °C	1
Denaturierung	15 s	95 °C	40
Hybridisierung und Elongation	60 s	60 °C	40

2.5.4.3 Auswertung der RT-qPCR

Die RT-qPCR Daten wurden während der Reaktion mit der dazugehörigen Software erfasst. Im Anschluss erfolgte die Auswertung nach der $\Delta\Delta CT$ Methode. Der *cycle of threshold*(CT)-Wert benennt die Anzahl an Zyklen, die benötigt wurden, um die zuvor festgelegte Schwelle an Fluoreszenzsignal zu erreichen. Dieser Schwellenwert gibt den Übergang von unspezifischer Emission zu eindeutigem Fluoreszenzsignal an und ist umso niedriger, je mehr Kopien eines Gens in der Probe enthalten sind. Der CT-Wert wurde dann bei jeder Probe auf das mitanalytierte *Housekeeping*-Gen bezogen. In der vorliegenden Arbeit waren dies die nicht regulierten und konstant exprimierte ribosomale RNAs (rRNAs) 18S und snRNAs U6. Zunächst wurden alle CT-Werte auf den Wert des *Housekeeping*-Gens bezogen, indem die Differenz gebildet wurde (ΔCT). Dann wurden die ΔCT -Werte der negativen Kontrollgruppe gemittelt und von jedem ΔCT -Wert abgezogen ($\Delta\Delta CT$). Der $\Delta\Delta CT$ -Wert wurde dann in eine negative Exponentialfunktion eingesetzt und dadurch auf 1 normiert ($2^{-(\Delta\Delta CT)}$).

2.6 Immunhistochemische Färbungen

2.6.1 Durchführung der Färbungen

Für die Auswertung der Kollagensynthese wurden die Zellen in den Kammern des *Chamber Slide*TM-Systems immunhistochemisch gefärbt. Dazu wurde ein erster Antikörper gegen Kollagen I verwendet, der dann mit einem zweiten fluoreszierenden Antikörper gegen diesen ersten für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung sichtbar gemacht wurde. Dazu wurden alle Kammern nach folgendem Protokoll gefärbt:

Die Zellen wurden zunächst mit 200 μ l PBS für fünf Minuten gewaschen. Danach wurden die Zellen mit je 200 μ l 4 % Paraformaldehyd Puffer für 30 Minuten fixiert. Im Anschluss folgten drei Waschschrte mit je 200 μ l PBS für je fünf Minuten, während die Objektträger die ganze Zeit bewegt wurden. Die Zellen wurden dann mit 200 μ l 0,25 % Triton X in DPBS für 30 Minuten bedeckt, um die Zellmembranen durchlässig zu machen. Anschließend wurden die Zellen wieder zweimal mit je 200 μ l DPBS für je fünf Minuten gewaschen. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten mit 200 μ l *Seablock*-Puffer geblockt. Dann wurden sie nochmal mit 200 μ l PBS für fünf Minuten gewaschen. Im Anschluss wurde der erste Antikörper, in diesem Fall ein Anti-Kollagen I Antikörper (ab34710) in der Konzentration 1:50 aufgetragen. Dazu wurde der Antikörper in *Seablock*-Puffer verdünnt und in jede Kammer 80 μ l gegeben. Die Objektträger wurden dann in einem feuchten Milieu, um sie vor dem Austrocknen zu schützen, über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte mit je 200 μ l DPBS für je fünf Minuten.

Alle nun folgenden Schritte wurden lichtgeschützt durchgeführt. Der zweite, nun lichtempfindliche, fluoreszierende Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:200

verdünnt in *Seablock*-Puffer in die Kammern gegeben und für eine Stunde bei Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit folgten drei Waschschritte mit 200 μ l DPBS für fünf Minuten. Danach wurde die Hoechst 33342-Färbung zum Anfärben der Zellkerne aufgetragen. Dazu wurde 1 μ l Hoechst-Lösung 1:10.000 in 10 ml DPBS verdünnt und jede Kammer für je eine Minute mit 100 μ l Hoechst-Lösung bedeckt. Im Anschluss wurden alle Kammern nochmals für fünf Minuten mit 200 μ l DPBS gewaschen. Danach wurden die Kammern vom Objektträger mit der vom Hersteller mitgelieferten Löse-Vorrichtung abgelöst und die Objektträger mit Eindeckmedium und einem Deckgläschen eingedeckt, sodass keine Blasen entstanden. Anschließend wurden die Objektträger zum Aushärten der Eindeckung bei 4 °C lichtgeschützt bis zur Analyse gelagert.

2.6.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Nach Abschluss der Färbung wurden die eingedeckten Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Dazu wurden von jedem Schnitt mehrere Bilder mit 20x Vergrößerung gemacht. Die Färbung mit Hoechst wurde im blauen Kanal mit 0,08 s und die Kollagen I Färbung mit Alexa Flour® 647 im roten Kanal mit 1,0 s Belichtungszeit aufgenommen.

Im Anschluss wurden die einzelnen Bilder mit der Image J Software des National Health Institutes ausgewertet. Dabei wurde das Bild zunächst in den blauen und den roten Kanal getrennt. Die Zellkerne wurden nach Umwandlung in ein binäres Bild gezählt. Die Intensität der Fluoreszenz im Bild des roten Kanals wurde wie folgt ausgewertet: Es wurde ein *Threshold* festgelegt, der die Bereiche mit Signal einschloss und die Bereiche zwischen den Zellen ausschloss. Anschließend wurden daraus *Regions of interest* (ROI) erstellt, die mindestens 50 Pixel groß sein mussten, um kleine Artefakte auszuschließen. Diese ROI wurden dann auf das gleiche Bild ohne *Threshold* angewendet und die *Mean intensity* in jedem ROI gemessen, was der durchschnittlichen Intensität in den jeweiligen Zellen entsprach. Anschließend wurden aus den Intensitäten aus einer Aufnahme der Mittelwert gebildet und als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Für jede Behandlungskondition wurden auf diese Weise neun Bilder ausgewertet. Die Werte dieser Bilder wurden im Anschluss auf einen Wert zwischen 0 und 1 normiert, um die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Bilder zu verbessern.

2.7 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Software Prism 7 verwendet. Dazu wurde zur Analyse zweier Gruppen ein t-Test bei gepaarten Stichproben verwendet. Die Messwerte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Ab einem *p*-Wert von $<0,05$ wurde das Ergebnis als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Expression von miR-146a ist in Aorten gealterter Mäuse erhöht

Zu Beginn erfolgte die Analyse der Expression von miR-146a in aortalem Gewebe von zehn Wochen alten Mäusen im Vergleich zu einem Jahr alten Mäusen. Damit wurde die Hypothese überprüft, dass die miR-146a im Alter vermehrt im aortalen Gewebe exprimiert wird (H1). Dazu waren bereits die Aorten von jungen und alten Mäusen entnommen worden. (Abschnitt 2.2) Aus diesen Geweben wurde anschließend die Expression von miR-146a gemessen, indem aus dem Gewebe die RNA extrahiert und mittels qPCR die Menge an miR-146a bestimmt wurde.

Dabei fand sich eine signifikante Hochregulierung von miR-146a in den Aorten der gealterten, ein Jahr alten Mäusen im Vergleich zu den jungen, zehn Wochen alten Mäusen.

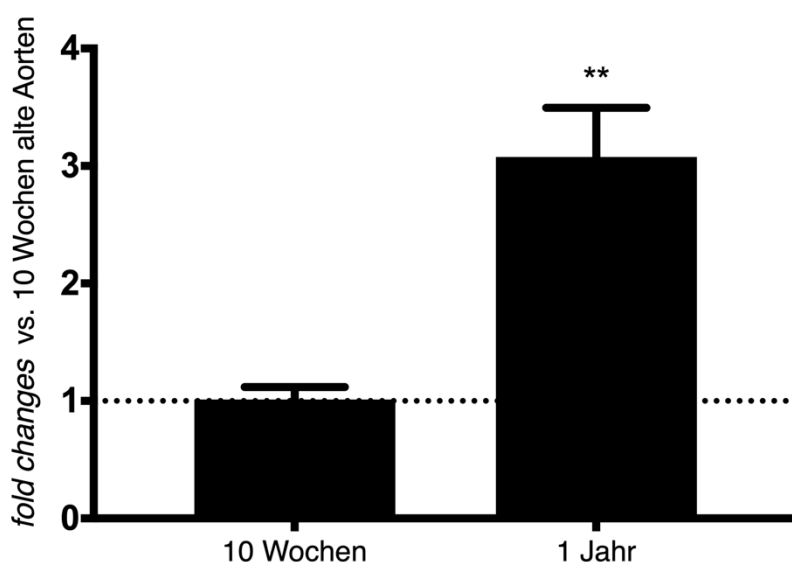


Abbildung 6: **Genexpression von miR-146a in murinem Aortengewebe.** Die Genexpression von miR-146a in gealtertem Gewebe (1 Jahr) ist gezeigt als Mittelwerte der *fold changes* \pm SEM; $n = 3$; im Vergleich zu jungem Gewebe (10 Wochen); ** $p < 0,01$

3.2 Erhöhte Matrixsteifigkeit reguliert Steifigkeitsmarker in HAoSMCs

Die Überprüfung der Hypothese, dass miR-146a abhängig von der Steifigkeit der umgebenen Matrix differentiell exprimiert wird (H2), erfolgte in zwei Schritten. Zur Simulation der unterschiedlichen Matrixsteifigkeiten wurden dafür mit Polyacrylamid beschichtete Zellkulturplatten verwendet. Diese wiesen deutlich niedrigere Elastizitätsmoduli auf, als die herkömmlichen, unbeschichteten Zellkulturplatten. (Abschnitt 2.4.2.1)

HAoSMCs wurden auf Zellkulturplatten mit unterschiedlichen Elastizitätsmoduli von jeweils 0,5 kPa, 25 kPa oder 10^7 kPa ausgesät und nach 48 Stunden Kultivierungszeit geerntet. Zu Kontrollzwecken erfolgte im ersten Schritt die Messung der Expression der als Steifigkeitsmarkergene etablierten *CTGF* und *ANKRD1*. (Abschnitt 1.1.5)

Dabei konnte eine signifikante Hochregulierung der genannten Gene in HAoSMCs auf den steiferen Zellkulturplatten (25 kPa und 10^7 kPa) im Vergleich zu den Zellen der weichen Platte (0,5 kPa) festgestellt werden. (Abbildung 7)

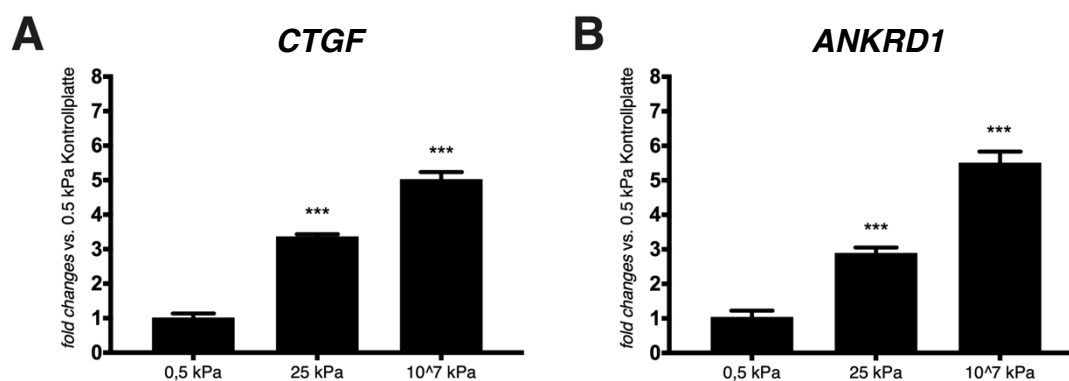


Abbildung 7: Genexpression der Steifigkeitsmarkergene in HAoSMCs auf unterschiedlich steifen Zellkulturplatten. Die Genexpression von **A** *CTGF* und **B** *ANKRD1* ist gezeigt als Mittelwerte der *fold changes* \pm SEM; n = 4; im Vergleich zur 0,5 kPa Kontroll-Platte; *** $p < 0,001$

3.3 miR-146a wird durch erhöhte Matrixsteifigkeit reguliert

Im zweiten Schritt der Überprüfung, dass miR-146a abhängig von der Steifigkeit der umgebenen Matrix differentiell exprimiert wird (H2), wurde im Anschluss die Expression von miR-146a in den HAoSMCs im gleichen Versuchsaufbau gemessen. Dazu wurden die HAoSMCs ebenfalls auf Zellkulturplatten mit unterschiedlichen Elastizitätsmoduli von jeweils 0,5 kPa, 25 kPa oder 10^7 kPa ausgesät und nach 48 Stunden Kultivierungszeit geerntet.

Auch hier konnte eine signifikante Hochregulierung von miR-146a in HAoSMCs auf den steiferen Zellkulturplatten (25 kPa und 10^7 kPa) im Vergleich zu den Zellen auf der weichen Platte (0,5 kPa) festgestellt werden. (Abbildung 8)

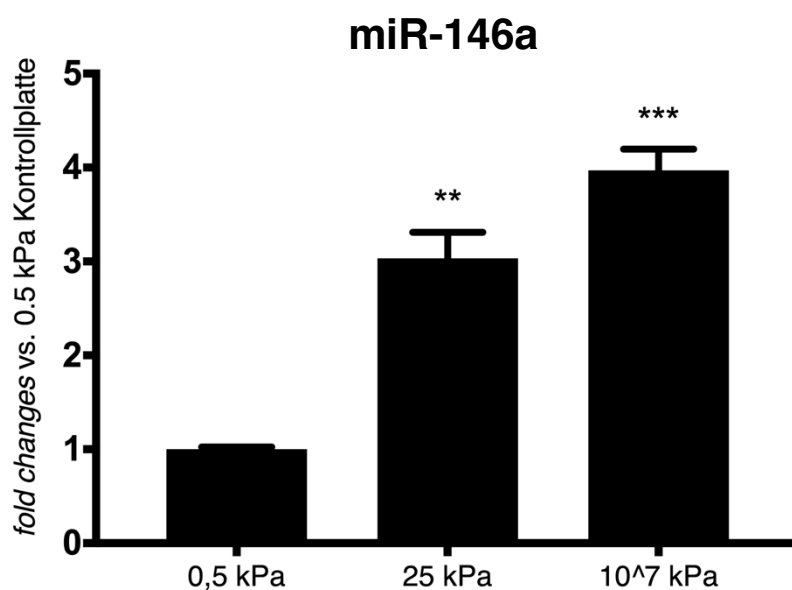


Abbildung 8: **Genexpression von miR-146a in HAoSMCs auf unterschiedlich steifen Zellkulturplatten.** Die Genexpression von miR-146a ist gezeigt als Mittelwerte der *fold changes* \pm SEM; $n = 3$; im Vergleich zur 0,5kPa Kontrollplatte; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.4 miR-146a reguliert profibrotische Gene in HAoSMCs

Ein wichtiger molekularer Mechanismus bei der Entstehung der altersbedingten arteriellen Gefäßversteifung ist die gesteigerte Kollagensynthese in den Gefäßwänden. Ein möglicher protektiver Effekt von miR-146a bei der Entstehung von arterieller Gefäßversteifung könnte durch einen hemmenden Effekt auf die Kollagensynthese zustande kommen. Dies geschieht potentiell über die Regulation der profibrotischen Gene *SMAD3* und *PLOD2*, womit miR-146a die Entstehung von vaskulärer Fibrose bremsen würde (H3). Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde der Einfluss von miR-146a auf eine Regulation von *SMAD3* und *PLOD2* untersucht. (Abschnitt 1.1.4) Dazu wurden HAoSMCs mit Modulatoren für miR-146a transfiziert und im Anschluss die Genexpression dieser Gene gemessen. (Abschnitt 2.4.4.1)

Bei den Modulatoren handelte es sich einerseits um miR-*Mimics*, die die Funktion der speziellen miR imitieren und miR-Inhibitoren, die spezifisch miRs binden und somit die Aktivität der bestimmten miR hemmen können. Die negative Kontrolle bestand aus einer zufälligen Sequenz, die keinen Einfluss auf die mRNA Aktivität nahm. (Abschnitt 2.4.4.1) Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurde die Genexpression von *IRAK1*, *SMAD3* und *PLOD2* gemessen. *IRAK1* diente hierbei als positive Kontrolle der Transfektion, da es als ein von miR-146a reguliertes Gen bereits etabliert ist. (Abschnitt 1.1.4)

Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Hochregulation von *SMAD3* und *PLOD2* in HAoSMCs nach Transfektion mit einem miR-Inhibitor im Vergleich zur Expression in Zellen, die mit der negativen Kontrolle transfiziert wurden. Weiterhin konnte eine signifikant verringerte Expression von *SMAD3* und *PLOD2* bei Transfektion der HAoSMCs mit einem

miR-*Mimic* im Vergleich zur Expression in mit negativer Kontrolle transfizierten Zellen festgestellt werden. (Abbildung 9)

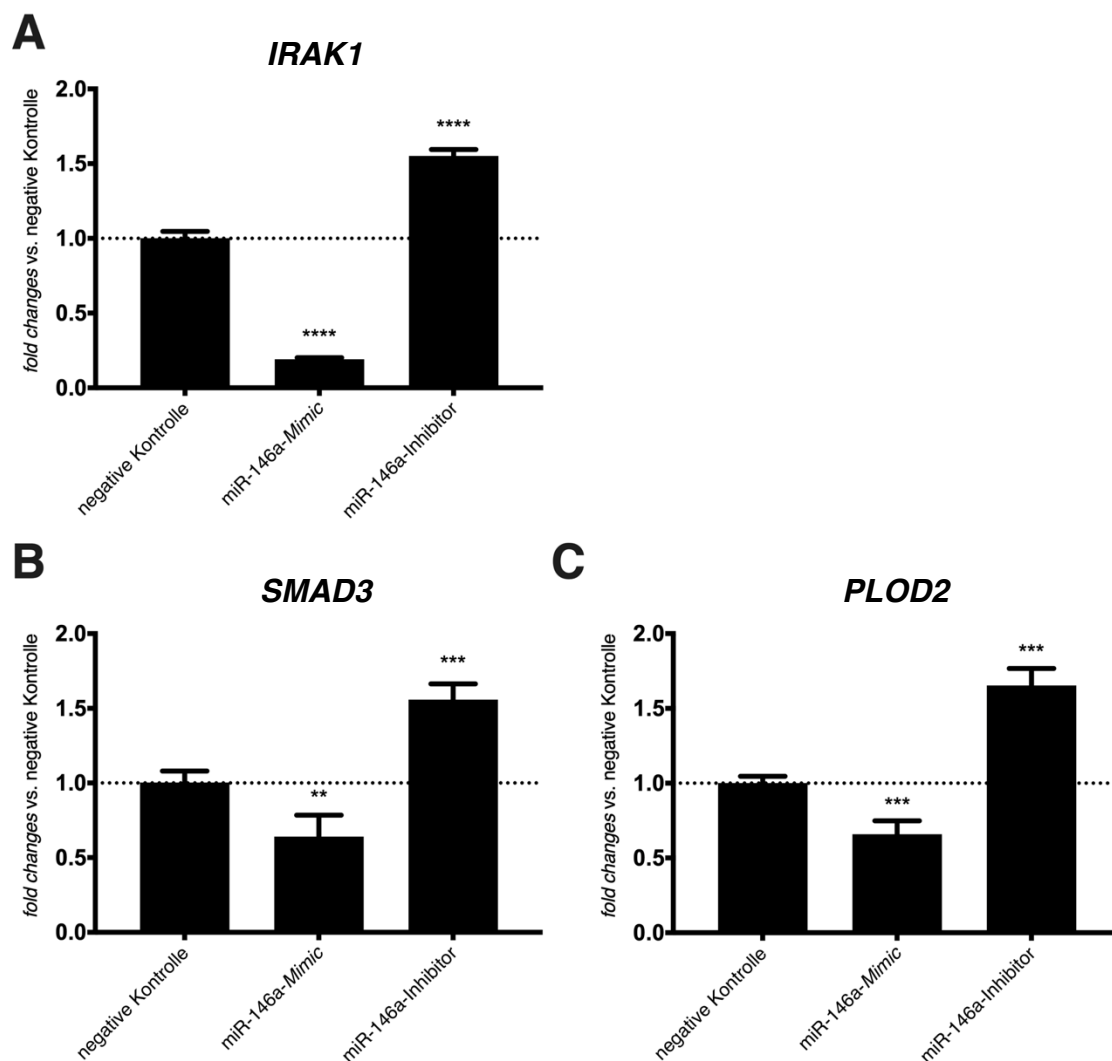


Abbildung 9: **MiR-146a-Modulation in HAoSMCs**. Genexpression von **A** *IRAK1* (sicher reguliertes Kontrollgen), **B** *SMAD3* und **C** *PLOD2* gezeigt als Mittelwerte der *fold changes* \pm SEM; n = 4; im Vergleich zur Transfektion der HAoSMCs mit negativer Kontrolle; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

3.5 Knockdown-Analyse mit *SMAD3* siRNA

Das SMAD3-Protein wurde als Transkriptionsfaktor von *PLOD2* bereits beschrieben. (Abschnitt 1.1.4.2) Daraus ergab sich die Hypothese, dass die Regulation von *PLOD2* nach Transfektion der HAoSMCs mit miR-146a-Modulatoren in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors SMAD3 stattfinden könnte (H4).

Um die SMAD3-abhängige Regulation von *PLOD2* genauer zu untersuchen, wurde siRNA genutzt, um einen *Knockdown* von *SMAD3* zu erreichen. SiRNAs sind kurze interferierende RNAs, mit denen die Expression eines bestimmten, interkalierenden Gens in der Zelle ausgeschaltet werden kann. Zunächst wurden HAoSMCs mit der siRNA transfiziert

(Zeitpunkt 1). Dieselben Zellen wurden dann 24 Stunden später mit den miR-146a-Modulatoren (*Mimic* oder Inhibitor) transfiziert (Zeitpunkt 2). (Abschnitt 2.4.4.2)

Vorher wurde die Genexpression von *SMAD3* in HAoSMCs gemessen, um zu überprüfen, ob der *Knockdown* mithilfe der siRNA ausreichend effektiv war. Dazu wurden HAoSMCs entweder mit siRNA oder negativer Kontrolle transfiziert. Um ebenfalls zu überprüfen, ob der *Knockdown* auch bei zusätzlicher Transfektion zum Zeitpunkt 2 effektiv war, wurden HAoSMCs mit siRNA an Zeitpunkt 1 und 24 Stunden später mit negativer Kontrolle (Zeitpunkt 2) transfiziert.

Die Genexpression von *SMAD3* war nach Transfektion mit siRNA im Vergleich zu den HAoSMCs, die mit negativer Kontrolle transfiziert wurden, signifikant herunterreguliert. Ebenso war die Genexpression für *SMAD3* bei Transfektion von siRNA an Zeitpunkt 1 und negativer Kontrolle an Zeitpunkt 2 signifikant herunterreguliert im Vergleich zu den HAoSMCs, die an beiden Zeitpunkten mit negativer Kontrolle transfiziert wurden. (Abbildung 10)

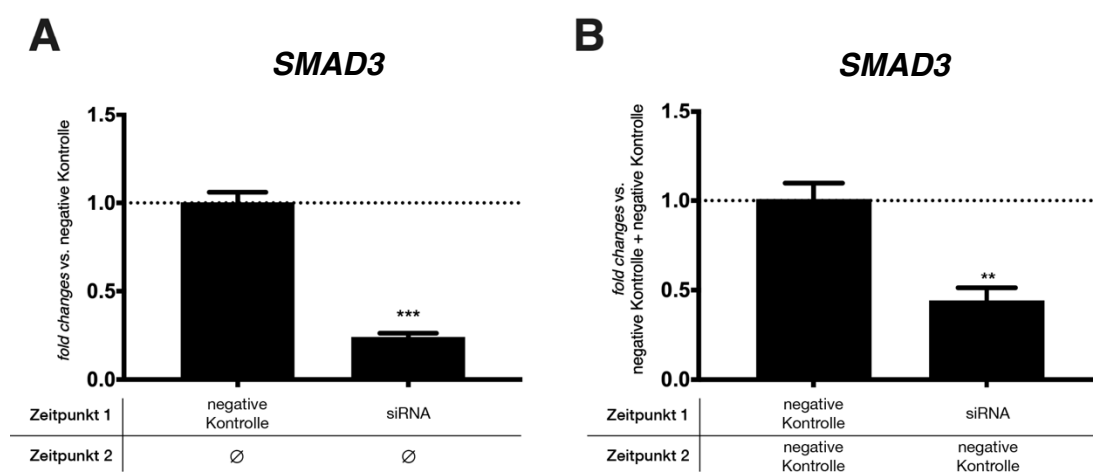


Abbildung 10: *SMAD3* siRNA *Knockdown* in HAoSMCs. **A** Genexpression von *SMAD3* bei einfacher Transfektion der HAoSMCs mit siRNA gezeigt als Mittelwerte der *fold changes* \pm SEM; n = 3; im Vergleich zu HAoSMCs, die nur mit negativer Kontrolle transfiziert wurden; *** $p < 0,001$. **B** Genexpression von *SMAD3* bei Transfektion der HAoSMCs mit siRNA (Zeitpunkt 1) und zusätzlicher Transfektion mit negativer Kontrolle nach 24 Stunden (Zeitpunkt 2) gezeigt als Mittelwerte der *fold changes* \pm SEM; n = 3; im Vergleich zu HAoSMCs, die an beiden Zeitpunkten jeweils nur mit negativer Kontrolle transfiziert wurden; ** $p < 0,01$

Als nächstes wurde die Genexpression von *PLOD2* gemessen. Dazu wurden HAoSMCs an Zeitpunkt 1 mit siRNA oder negativer Kontrolle transfiziert und 24 Stunden später (Zeitpunkt 2) mit negativer Kontrolle oder den miR-146a-Modulatoren (*Mimic* oder Inhibitor). Die Analyse der Genexpression ergab dabei keine signifikante Regulation von *PLOD2*. (Abbildung 11)

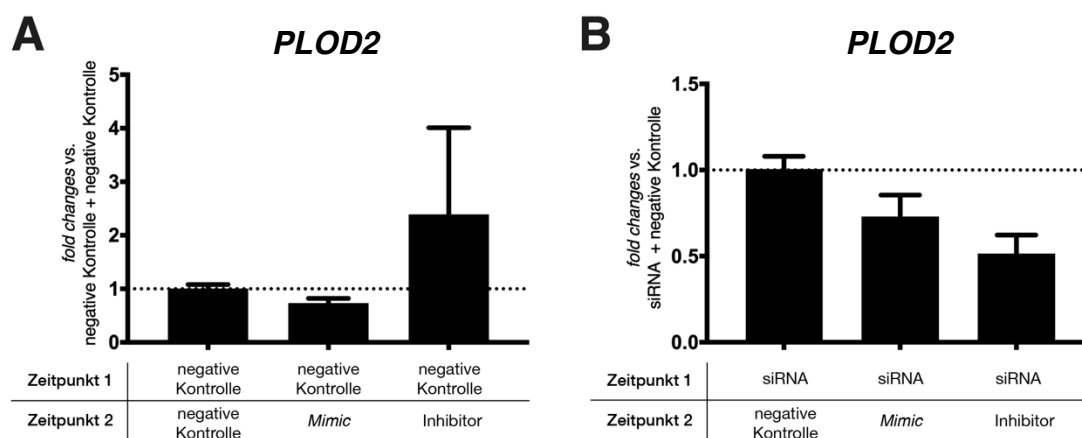


Abbildung 11: **SMAD3** siRNA *Knockdown* und miR-146a Modulation in HAoSMCs. **A** Genexpression von *PLOD2* bei Transfektion der HAoSMCs mit negativer Kontrolle (Zeitpunkt 1) und zusätzlicher Transfektion mit miR-146a-Modulatoren (*Mimic* und Inhibitor) 24 Stunden später (Zeitpunkt 2) gezeigt als Mittelwerte der *fold changes* \pm SEM; $n = 3$; im Vergleich zu HAoSMCs, die an beiden Zeitpunkten jeweils mit negativer Kontrolle transfiziert wurden. **B** Genexpression von *PLOD2* bei Transfektion der HAoSMCs mit siRNA (Zeitpunkt 1) und zusätzlicher Transfektion mit miR-146a-Modulatoren (*Mimic* und Inhibitor) 24 Stunden später (Zeitpunkt 2) gezeigt als Mittelwerte der *fold changes* \pm SEM; $n = 3$; im Vergleich zu HAoSMCs, die mit siRNA (Zeitpunkt 1) und negativer Kontrolle (Zeitpunkt 2) transfiziert wurden.

3.6 miR-146a reguliert die Kollagensynthese in HAoSMCs

In den vorausgehenden Experimenten wurde der Einfluss von miR-146a auf profibrotische Gene untersucht. Um die Auswirkungen der Genregulation durch miR-146a auf die tatsächliche Synthese von Kollagenproteinen in HAoSMCs zu untersuchen, wurde ein *Scar-in-a-jar Assay* durchgeführt. Dabei wurde die Hypothese überprüft, dass miR-146a die Synthese von Kollagenmolekülen hemmt (H5). Das Protokoll dieses *Assays* erlaubt die funktionelle Analyse der Kollagensynthese in einer einzigen Zellkulturkammer. Entscheidende Bestandteile des Protokolls sind die Zugabe von folgenden Stoffen: L-Ascorbinsäure, als Kofaktor der Kollagensynthese, TGF- β 1, als profibrotischer Regulator und DxS, das für beengte Bedingungen innerhalb der Kammer sorgte und damit zu einer beschleunigten Kollagensynthese führte. (Abschnitt 2.4.5)

Zu Beginn des Experiments stand die Transfektion der HAoSMCs mit miR-146a-Inhibitor, miR-146a-*Mimic* sowie negativer Kontrolle. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung mit den oben beschriebenen Zusätzen nach dem *Scar-in-a-jar Assay* Protokoll. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation wurden sowohl das Kollagen als auch die Zellkerne in den HAoSMCs per Immunofluoreszenz markiert und die Rotfluoreszenz des Kollagens sowie die Blaufluoreszenz der Zellkerne semiquantitativ am Computer ausgewertet. (Abschnitt 2.6)

Die Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Bilder ergab ein signifikant gesteigertes Rotfluoreszenzsignal in den HAoSMCs, die mit miR-146a-Inhibitor transfiziert wurden, verglichen mit den Zellen, die mit negativer Kontrolle transfiziert wurden. Die HAoSMCs,

die mit einem miR-146a-*Mimic* transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zu den Zellen, die mit negativer Kontrolle behandelt wurden, ein signifikant erniedrigtes Rotfluoreszenzsignal. (Abbildung 12)

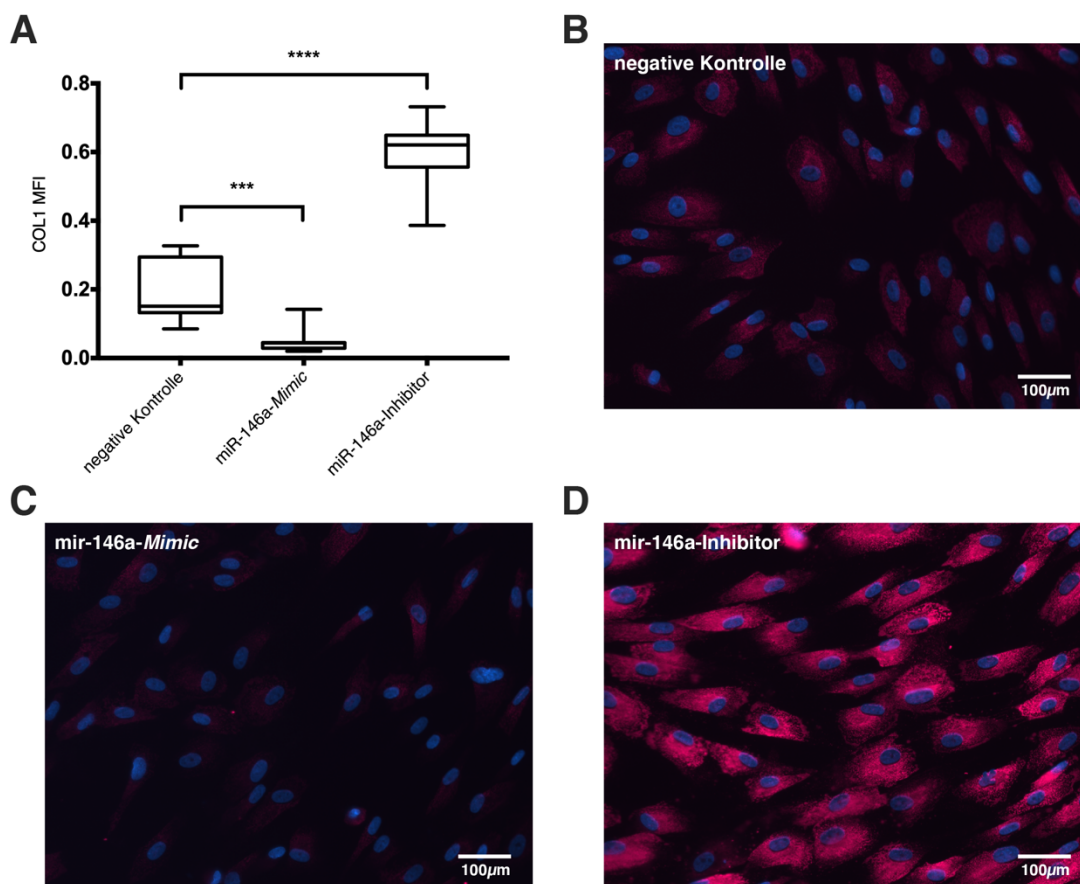


Abbildung 12: *Scar-in-a-jar Assay* in HAoSMCs. **A** Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Färbung von HAoSMCs für humanes Kollagen-I; n = 9; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Beispielbilder bei 20x Vergrößerung, blauer Kanal = Zellkerne, roter Kanal = humanes Kollagen I, alle Zellen wurden mit 25 μg DxS, 100 μM Ascorbinsäure und 5 ng/ml humanes TGF- β 1 behandelt und zusätzlich transfiziert mit **B** negativer Kontrolle, **C** miR-146a-*Mimic* und **D** miR-146a-Inhibitor.

4 Diskussion

Die altersbedingte arterielle Gefäßversteifung stellt ein schwerwiegendes kardiovaskuläres Krankheitsbild, sowie einen Risikofaktor für Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, wie Schlaganfall, Herzinsuffizienz oder Niereninsuffizienz dar (O'Rourke und Hashimoto 2007; Safar und Lacolley 2007). Die Ursachen und Hintergründe der Entstehung von arterieller Gefäßversteifung sind Teil der aktuellen medizinischen Forschung (DuPont JJ et al. 2019; Lyle und Raaz 2017). MiRs bieten durch ihre Eigenschaft, ganze Gennetzwerke zu regulieren, die Möglichkeit, bei Erkrankungen, denen komplexe Mechanismen zugrunde liegen, Anwendung zu finden (Krek et al. 2005). Der arteriellen Gefäßversteifung liegen gleich mehrere solcher Mechanismen zugrunde, etwa die vaskuläre Inflammation, Kalzifikation, Elastinfragmentierung oder die vaskuläre Fibrose (Lyle und Raaz 2017; Schellinger et al. 2019). Vor diesem Hintergrund war es Ziel der vorliegenden Arbeit, zu untersuchen, inwieweit miR-146a die komplexen Mechanismen, die der gesteigerten Kollagensynthese im Rahmen der altersbedingten arteriellen Gefäßversteifung zugrunde liegen, reguliert.

Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass erhöhte Matrixsteifigkeit die Expression von miR-146a steigert. Untersuchungen zum Einfluss von miR-146a auf die vaskuläre Fibrose haben *SMAD3* als Zielgen von miR-146a bestätigt und *PLOD2* als potentiell unbekanntes Zielgen etabliert. Weiterhin ergaben funktionelle Analysen, dass miR-146a die Synthese von Kollagenmolekülen hemmt.

4.1 Diskussion der Hypothesen

4.1.1 miR-146a wird in gealterten Aorten vermehrt exprimiert

Der überwiegende Teil der Forschung zu miR-146a befasst sich mit Regulationen im Rahmen der angeborenen Immunantwort (Rusca und Monticelli 2011). Die Studie von Rezvan et al. (2014) legt allerdings nahe, dass miR-146a auch bei der altersbedingten, arteriellen Gefäßversteifung eine Rolle spielt. In ihrer Studie konnten sie bei Patient:innen mit nachweislich steiferen Gefäßen erhöhte Level von zirkulierender miR-146a im Blut nachweisen. Da Alterung sich unter anderem als erhöhte Gefäßsteifigkeit im menschlichen Organismus manifestiert, ließ sich die Hypothese ableiten, dass ein vermehrtes Vorkommen von miR-146a im Blut auf eine Steigerung von miR-146a im Aortengewebe zurückzuführen sein könnte.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Expressionslevel von miR-146a in Aorten gealterter Mäuse gegenüber Aorten junger Mäuse signifikant erhöht sind. Dies passt zunächst zu den Ergebnissen von Rezvan et al. (2014). Weiterhin stützen die Ergebnisse auch die Hypothese, dass die Erhöhung der Level von zirkulierender miR-146a im Alter durch eine vermehrte Expression von miR-146a im Aortengewebe zustande kommen könnte. Weiterführende Untersuchungen könnten untersuchen, ob die zirkulierenden miRs

tatsächlich aus der Aorta stammen, indem Experimente mit markierten miRs durchgeführt werden. Dazu könnten Methoden verwendet werden, die beispielsweise fluoreszierende Nanopartikel nutzen, um miRs *in vivo* zu markieren und zu detektieren (Hernandez et al. 2013; Hwang et al. 2010).

Die Ergebnisse stehen außerdem in Einklang mit mehreren Untersuchungen an gealterten, sogenannten seneszenten Zellen. In mehreren Studien wurde eine erhöhte Genexpression von miR-146a in alten Zellen im Vergleich zu jungen Zellen nachgewiesen (Bhaumik et al. 2009; Bonifacio und Jarstfer 2010; Christoffersen et al. 2010). Olivieri et al. (2013) haben zudem miRNA Expressionsmuster in gealterten Gefäßzellen aus der Nabelschnurvene, der Aorta und der Koronararterie analysiert. Dabei zeigte sich in allen drei Zellreihen eine Hochregulation von miR-146a mit zunehmender Zellpassage mit der höchsten Expression in humanen Endothelzellen aus der Aorta. Auch diese Untersuchung passt zu der These, dass es zur Überexpression von miR-146a im hohen Alter überproportional im Aortengewebe kommt.

Andere Quellen zeigen jedoch keine signifikante Regulation von miR-146a in gealterten Zellen (Hackl et al. 2010) oder sogar eine Herunterregulierung in humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (Vasa-Nicotera et al. 2011). Eine vergleichende Untersuchung mit verschiedenen Zellreihen könnte zur Klärung beitragen und methodische Unterschiede in den einzelnen Studien ausgleichen. Weiterhin schlagen Dimmeler und Nicotera (2013) in ihrem Übersichtsartikel einen Erklärungsansatz für diese Diskrepanzen in den unterschiedlichen Studien vor. Möglicherweise läge ein Feedbackmechanismus zugrunde, über den nach anfänglich absinkenden miR-146a Leveln bei zunehmender Zellalterung mit einer Hochregulierung der miR-146a gegengesteuert wird. Dieser Mechanismus würde auch zu der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Hypothese passen, dass die Hochregulierung von miR-146a im Rahmen der altersbedingten, arteriellen Gefäßversteifung durch einen Feedbackmechanismus zur Bremsung der Versteifung geschieht.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse erstmals die Erhöhung von miR-146a im seneszenten, murinen Aortengewebe.

4.1.2 miR-146a wird in Abhängigkeit der Matrixsteifigkeit exprimiert

Gefäßalterung und Gefäßsteifigkeit gehören nachweislich zusammen: das Alter ist der wichtigste Risikofaktor der arteriellen Gefäßversteifung und gleichzeitig ist die arterielle Gefäßversteifung gefährliche Folge des Alters im Gefäß (Ferrari et al. 2003; Schellinger et al. 2019; Ungvari et al. 2010). Aus diesem Grund lag den vorliegenden Untersuchungen die Hypothese zugrunde, dass die Erhöhung der Expression von miR-146a in den gealterten, murinen Aorten entscheidend durch die erhöhte Matrixsteifigkeit des Gewebes ausgelöst und getrieben wird.

Für die Überprüfung dieser These in einem *In-vitro*-Experiment wurden kommerziell erworbene Zellkulturplatten verwendet, bei denen mittels einer Polyacrylamid Beschichtung

das Elastizitätsmodul der Oberfläche verändert war. Die Elastizität von 0.5 kPa ist sehr weich und vergleichbar mit dem Gewebe des Gehirns (Taylor und Miller 2004). 25 kPa ist vergleichbar mit eher steifen Geweben wie dem Herzmuskel (Mathur et al. 2001), aber immer noch deutlich weicher als herkömmliche Zellkulturplatten aus Polystyrol mit einem Elastizitätsmodul von circa 10^6 kPa (Callister Jr. und Rethwisch 2007).

Die vorliegenden Ergebnisse konnten zeigen, dass die Genexpressionslevel von *CTGF*, *ANKRD1* und miR-146a in Zellen, die auf steifen Zellkulturplatten kultiviert worden waren, signifikant hochreguliert waren. *CTGF* und *ANKRD1* werden als Steifigkeitsmarkergene genutzt. Sie werden unter anderem von YAP/TAZ reguliert, die wiederum auf Änderungen der Matrixsteifigkeit oder der Zellform reagieren (Dupont S et al. 2011). Die festgestellte gleichzeitige Regulation von miR-146a und den Steifigkeitsmarkergenen spricht dafür, dass miR-146a durch die steife Matrixumgebung und die damit verbundene mechanische Reizung hochreguliert ist.

MiR-146a wurde bereits im Rahmen von mechanischer Reizung untersucht. Huang et al. (2012) zeigten, dass miR-146a in humanen Epithelzellen aus den kleinen Atemwegen, die mit oszillierendem Ventilationsdruck getriggert wurden, signifikant hochreguliert ist. Dabei handelt es sich um ein Modell für die mechanisch induzierte Inflammation von Lungenepithel. Damit stehen die hier vorliegenden Ergebnisse zur mechanosensiblen Regulierung von miR-146a im Einklang mit dieser Studie.

Insgesamt konnte erstmals gezeigt werden, dass miR-146a in Abhängigkeit der Matrixsteifigkeit exprimiert wird. Je steifer die Matrix um die Zellen desto höher ist die Expression von miR-146a.

4.1.3 miR-146a reguliert *SMAD3* und *PLOD2* als profibrotische Gene

Weiterführende Experimente beleuchteten die Regulationen durch miR-146a im Rahmen der gesteigerten Kollagensynthese und damit einhergehender vaskulärer Fibrose. Dabei handelt es sich um einen der zentralen molekularen Mechanismen der arteriellen Gefäßversteifung (Lakatta 2003; Wang M et al. 2007). Die Kollagensynthese wird unter anderem über die TGF- β 1/SMAD3-Signalkaskade reguliert, wobei TGF- β 1 als ein wichtiges profibrotisches Zytokin etabliert ist (Ruiz-Ortega et al. 2007). Weiterhin ist bereits bekannt, dass der Transkriptionsfaktor SMAD3 neben der Kollagensynthese auch die Expression von *PLOD2* reguliert, welches ein entscheidendes Gen während der Synthese von Kollagen-*Crosslinks*, insbesondere den HP darstellt (Gjaltema et al. 2015). Die vaskuläre Fibrose wird daher einerseits durch die gesteigerte Kollagensynthese, ausgehend vom TGF- β 1/SMAD3-Signalweg und andererseits durch vermehrtes HP-*Crosslinking*, ausgehend von *PLOD2* und der damit verbundenen Aktivität der LH2 reguliert. *SMAD3* und *PLOD2* stellen damit potentiell wichtige Zielgene bei der Entstehung vaskulärer Fibrose dar.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine signifikante Hochregulierung von *IRAK1*, *SMAD3* und *PLOD2* nach Transfektion mit miR-146a-Inhibitor, sowie eine signifikante

Herunterregulierung nach Transfektion mit miR-146a-*Mimic*. *IRAK1* wurde als langjährig etabliertes Zielgen von miR-146a in diesem Fall als Kontrollgen genutzt (Taganov et al. 2006). Dessen Expression spricht dafür, dass die Transfektion und anschließende gezielte Regulation mit den miR-146a-Modulatoren erfolgreich waren. Die Regulation von *SMAD3* und *PLOD2* deutet darauf hin, dass ein erhöhtes Level von miR-146a die Expression dieser Gene hemmt und damit protektiv auf die Expression der profibrotischen Gene wirkt. Damit scheint miR-146a der Kollagenproduktion und damit der Entstehung von Fibrose entgegenzuwirken. Dies geht mit der Vermutung einher, dass miR-146a als Feedbackregulator bei der arteriellen Gefäßversteifung wirkt. Bei erhöhter Matrixsteifigkeit wird miR-146a hochreguliert, um durch Hemmung der gesteigerten Kollagensynthese den Mechanismus der vaskulären Fibrose zu bremsen.

Cheung et al. (2014) konnten die Regulation von *SMAD3* und auch *SMAD2* durch miR-146a ebenfalls feststellen. In ihrer Studie wurde miR-146a im Rahmen der Osteogenese an fetalen Stammzellen aus dem Femur untersucht. In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von miR-146a auf die TGF- β /SMAD-abhängige Fibrose nach Muskelkontusionen untersucht. Auch hier zeigte sich ein protektiver Effekt durch miR-146a auf die Fibrose im Muskelgewebe (Sun et al. 2017).

Die vorliegenden Ergebnisse stehen außerdem in Einklang mit den Untersuchungen von Qiu M et al. (2020), die *SMAD3* mittels Luciferase *Assay* als Zielgen von miR-146a beschrieben haben. Das Luciferase *Assay* nutzt das Gen der Luciferase, einem Enzym, das Lichtenergie erzeugt. In einen Vektor wird sowohl das Luciferase Gen als auch die 3'UTR Region der mRNA des fraglichen Gens geklont und dann in Zellen transfiziert. Anschließend kann mit einem Luminometer genau gemessen werden, ob das Gen der Luciferase von einer miR zusammen mit der 3'UTR Region reguliert wurde. Auf diese Weise kann gezeigt werden, dass eine miR tatsächlich an die fragliche 3'UTR Region bindet, im Anschluss die Synthese der Luciferase hemmt und darüber die Produktion von Licht verringert (Brasier et al. 1989). Studien zum Einfluss von miR-146a auf *PLOD2* gibt es bisher noch nicht. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen hingegen erstmals eine differentielle Expression von *PLOD2* nach Transfektion mit miR-146a-Modulatoren auf.

Insgesamt bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die Hypothese, dass miR-146a über die Regulation von *SMAD3* die vaskuläre Fibrose hemmt. Weiterführend bestätigen die Ergebnisse *SMAD3* als bereits bekanntes Zielgen von miR-146a und schlagen ein weiteres, bisher unbekanntes Zielgen *PLOD2* vor.

4.1.4 miR-146a reguliert *PLOD2* in Abhängigkeit von *SMAD3*

PLOD2 kodiert für das Enzym LH2, welches die Synthese von Kollagen-HP-*Crosslinks* gegenüber Kollagen-LP-*Crosslinks* begünstigt (Van der Slot et al. 2003). HP sorgen für zusätzliche Stabilität zwischen den Kollagenmolekülen und kommen gehäuft in fibrotischem Gewebe vor (Last et al. 1990; Uzawa et al. 1998). Außerdem sind HP verglichen mit LP

besonders stabil und langlebig und können weniger leicht abgebaut werden (Van der Slot-Verhoeven et al. 2005). *PLOD2* ist daher als Marker für fibrotische Prozesse anerkannt. Die Studie von Gjaltema et al. (2015) hat daher den Zusammenhang zwischen *PLOD2* und dem profibrotischen Zytokin TGF- β untersucht, um weiteren Aufschluss über zugrundeliegende Signalwege zu erlangen. Dabei konnte gezeigt werden, dass SMAD3 als Transkriptionsfaktor mitwirkt, wenn *PLOD2* transkribiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde daher postuliert, dass die Regulation von *PLOD2* durch miR-146a in Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor SMAD3 auftritt.

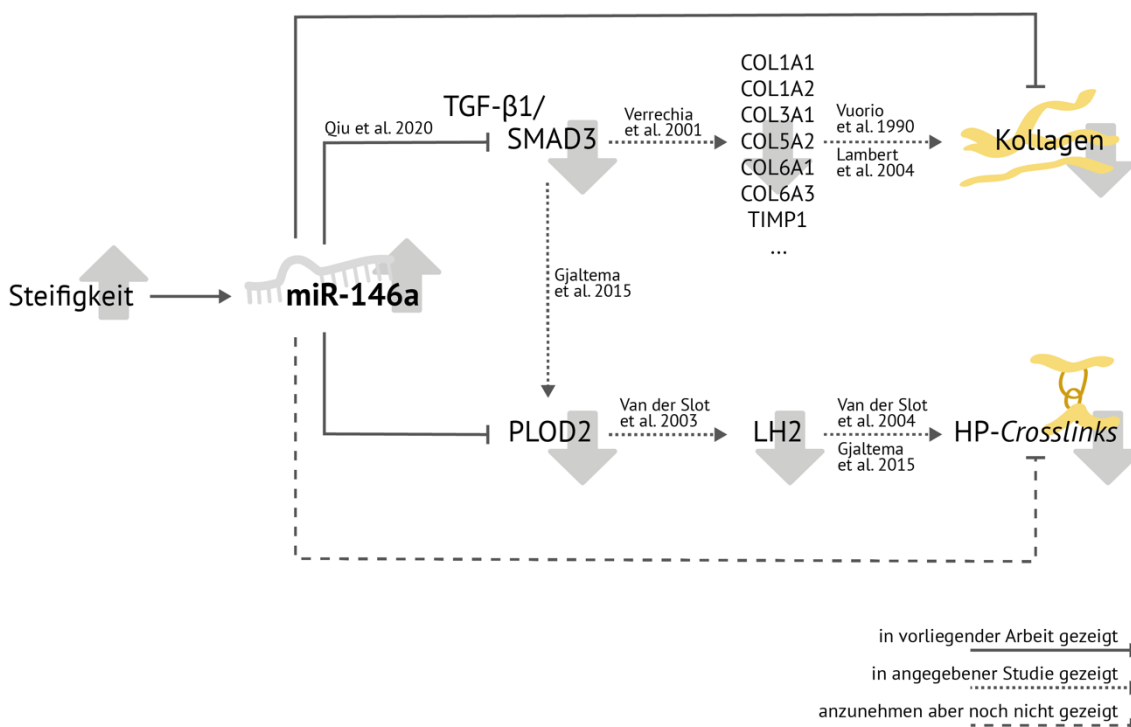


Abbildung 13: Schema des zugrundeliegenden Signalwegs.

Zur Überprüfung wurde ein Experiment mit siRNA durchgeführt, mit der ein *Knockdown* von *SMAD3* erreicht werden konnte. Dabei lag die Frage zugrunde, ob die signifikante Hoch- und Herunterregulation von *PLOD2* nach Transfektion von *Mimic* bzw. Inhibitor ausbleibt, sobald ebenfalls eine Transfektion mit siRNA erfolgt. Die Ergebnisse zeigten zunächst eine signifikante Herunterregulation von *SMAD3* nach siRNA *Knockdown* des Gens. Dies spricht dafür, dass das *Knockdown* erfolgreich war. Die Analyse der Genexpression von *PLOD2* ergab allerdings wider Erwarten keine signifikanten Ergebnisse. Damit kann anhand der vorliegenden Ergebnisse keine Aussage über die postulierte Hypothese getroffen werden.

Die oben bereits erläuterten Ergebnisse der Untersuchungen von Gjaltema et al. (2015) zeigen eindeutig die Regulation von *PLOD2* durch den Transkriptionsfaktor SMAD3. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus Abbildung 9C und Abbildung 11A legt darüber hinaus nahe, dass die Bedingungen bei einmaliger Transfektion und zweimaliger

Transfektion nicht vergleichbar sind. Aus diesem Grund müsste der hier vorliegende Versuchsansatz zunächst verbessert werden, bevor die Hypothese bestätigt oder widerlegt werden kann. Dies könnte beispielsweise eine Optimierung der verwendeten Konzentrationen und Zeitpunkte beinhalten. Denkbar wäre, dass die Zeit zwischen den Transfektionen an Zeitpunkt 1 und 2 zu lang ist, und die miR-146a-Modulatoren keinen ausreichenden Effekt mehr erreichen können, oder gar mit der siRNA interagieren.

Zusammenfassend kann eine Regulation von *PLOD2* durch den Transkriptionsfaktor SMAD3 aufgrund der eindeutigen Studienlage weiter angenommen werden. Der den hier vorliegenden Ergebnissen zugrundeliegende Versuchsansatz ist noch nicht ausreichend optimiert.

4.1.5 miR-146a hemmt die Synthese von Kollagenmolekülen

Die Regulation der Gene *SMAD3* und *PLOD2* durch miR-146a legt eine Auswirkung auf die Kollagensynthese nahe. Um die tatsächlichen Auswirkungen auf die Kollagenmoleküle zu untersuchen, wurde ein *Scar-in-a-jar Assay* als funktionelle Kollagenmessung durchgeführt (Chen et al. 2009). Der Versuchsansatz erlaubte, die produzierte Menge an Kollagen I nach Transfektion der Zellen mit miR-146a-Modulatoren in fluoreszierenden Bildern sichtbar zu machen und anschließend quantitativ auszuwerten.

Für die mit miR-146a-*Mimic* transfizierten Zellen ergab die Analyse der immunofluoreszierenden Bildern signifikant weniger Kollagen I als für die Kontrollzellen. Die mit miR-146a-Inhibitor transfizierten Zellen, enthielten signifikant erhöhte Mengen an Kollagen I. Diese Ergebnisse sprechen für eine miR-146a-vermittelte Hemmung der Kollagensynthese in glatten Gefäßmuskelzellen und die damit einhergehende Reduktion von Fibrose in Gefäßen. Damit ist es gelungen, den Einfluss von miR-146a auf die Synthese von Kollagen I erstmalig in VSMCs in einem Zellkulturmodell nachzuweisen. Somit kann ein protektiver Einfluss von miR-146a auf die vaskuläre Fibrose angenommen werden.

Feng et al. (2017) untersuchten ebenfalls den Einfluss von miR-146a auf die Fibrose in Herzen diabetischer Mäuse. In ihrer Studie war miR-146a überexprimiert zu finden und eine signifikante Zunahme der Fibrose zu beobachten. Der Einfluss von miR-146a auf die renale Fibrose wurde von Morishita et al. (2015) untersucht. Dort wurde miR-146a mithilfe von Nanopartikeln aus Polyethylenimin Mäusen mit renaler Fibrose injiziert, die zuvor mittels unilateraler, urethraler Obstruktion hervorgerufen wurde. Bei den Mäusen, die mit miR-146a behandelt wurden, zeigte sich eine signifikante Reduktion von renaler Fibrose im Vergleich zu den Kontrollmäusen.

Vor dem Hintergrund der bereits erläuterten Ergebnisse zur Regulation über SMAD3 sind die vorliegenden Ergebnisse des *Assays* kongruent zu den Untersuchungen von Verrecchia et al. (2001). In ihrer Studie zeigten sie, dass zahlreiche Gene der Kollagensynthese durch TGF- β 1 und den Transkriptionsfaktor SMAD3 reguliert werden, darunter *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *COL6A1*, *COL6A3* und *TIMP1*. Dies stellt einen

Erklärungsansatz für die Signalkaskade dar, die von miR-146a über die Regulation von *SMAD3* zur gesteigerten Kollagensynthese führt. (Abbildung 13) MiR-146a hemmt die Synthese von SMAD3, wodurch der Transkriptionsfaktor für die Expression der verschiedenen Gene für Kollagen fehlt und im Anschluss weniger Kollagenmoleküle synthetisiert werden.

Das *Scar-in-a-jar Assay* stellt im Allgemeinen eine elegante Möglichkeit dar, den Einfluss unterschiedlicher Stoffe auf die Kollagensynthese in kurzer Zeit und in einer Zellkulturkammer zu untersuchen. Dazu schlagen Chen et al. (2009) zwei unterschiedliche Protokolle vor: den *rapid deposition mode* mittels DxS und den *accelerated mode* mittels einer Kombination von Ficoll 70 und 400. DxS ist ein Makromolekül bestehend aus zahlreichen Glucosemolekülen, mit jeweils 2 Sulfatgruppen. Das hier eingesetzte DxS hat eine molekulare Masse >500.000 kDa. Ficoll ist ein hydrophiles Makromolekül aus Polysaccharose.

In dieser Arbeit wurde der *rapid deposition mode* mit DxS gewählt, der es innerhalb von 48 Stunden erlaubt, relevante Mengen an Kollagen I zu erhalten. Allerdings entsteht in dieser kurzen Zeit vorwiegend granuläres Kollagen ohne alle Hydroxilierungen und Quervernetzungen, aufgrund der extrem angeregten und stimulierten Stoffwechselsituation innerhalb der Zellkulturkammer (Chen et al. 2009). Dies war auch auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dieser Arbeit zu beobachten. Das gefärbte Kollagen lag intrazellulär in granulären Haufen und Ansammlungen vor. Das *Assay* erlaubt damit lediglich eine Einschätzung der Auswirkungen des Experiments auf die grundsätzliche Synthese von Kollagen, aber keineswegs eine Einschätzung der Qualität des entstehenden Kollagens. Sollte das entstehende Kollagen im Gegensatz zur Kontrolle beispielsweise Mängel aufweisen, könnte es mit diesem Modell nicht erkannt werden. Um umfassendere Informationen über die Auswirkungen des Experiments auf die Qualität des Kollagens zu bekommen, könnte ein weiteres *Assay* zielführend sein. Der *accelerated mode* des *Scar-in-a-jar* Protokolls produziert beispielsweise größere Mengen an *Crosslinks* zwischen den Molekülen und könnte als zusätzliche Methode Aufschluss über das retikuläre Kollagen geben (Chen et al. 2009).

Die Hinzugabe von TGF- β 1 stellt einen starken profibrotischen Reiz dar. Dieser kann im Zusammenhang mit der arteriellen Gefäßversteifung als gewünscht und physiologisch angesehen werden, da in der versteiften Aorta bereits eine inflammatorische und fibrotische Stoffwechsellaage vorliegt (Wang M et al. 2007). Wang M et al. (2006) finden ebenfalls ein erhöhtes TGF- β 1-*Signaling* mit zunehmendem Alter in der Aortenwand. Weiterführende Untersuchungen ohne die zusätzliche Stimulierung der Zellen mit TGF- β 1 würden dennoch die Möglichkeit bieten, eine bessere Aussagekraft für die nicht-inflammatorische Stoffwechsellaage zu gewinnen.

Die Ergebnisse des *Scar-in-a-jar Assays* zeigten insgesamt erstmals, dass miR-146a die Synthese von Kollagenmolekülen vermindert.

4.2 Allgemeine Limitationen

Neben den bereits erläuterten Limitationen der einzelnen Versuchsansätze lassen sich auch allgemeine Limitationen der vorliegenden Arbeit feststellen. Die Mehrheit der Untersuchungen zur vorgeschlagenen Regulation der vaskulären Fibrose von miR-146a im Rahmen der arteriellen Gefäßversteifung wurden mithilfe von *In-vitro*-Modellen durchgeführt. Diese Methoden erlauben die grundlegende Erforschung von Signalkaskaden an einzelnen Zellreihen, können aber keine Auskunft über die Auswirkungen der Regulation von beispielsweise miR-146a auf einen gesamten Organismus liefern. Erkenntnisse, die *in vitro* etabliert wurden, müssen daher als nächsten Schritt mithilfe von *In-vivo*-Modellen bestätigt werden. Zunächst könnten dabei Applikationen von miR-146a in Kleintiermodellen, wie Mäusen, vorgenommen werden und anschließend das Aortengewebe auf eine Regulation von profibrotischen Genen wie *SMAD3* und *PLOD2* überprüft werden. Darauf aufbauend könnte zudem die Verwendung von Großtiermodellen, beispielsweise von Schweinen, gerade im Kontext der arteriellen Gefäßversteifung interessant sein. Schweine sind für die Translation von Erkenntnissen auf den Menschen in der kardiovaskulären Forschung gut geeignet, da ihr Herz-Kreislauf-System dem des Menschen sehr ähnlich ist. Viele Parameter, wie Herzfrequenz oder Blutvolumen, sind nahezu identisch (Elmadhun et al. 2013).

4.3 Ausblick

4.3.1 Ergänzende Untersuchungen

Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich weitere ergänzende Untersuchungen ableiten. Einige Abschnitte der vorgeschlagenen Signalkaskade sind bereits in anderen Studien beschrieben worden, andere müssen noch etabliert werden. (Abbildung 13) Die oben dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass miR-146a über die Regulation von *SMAD3* und potentiell *PLOD2* die gesteigerte Kollagensynthese im Rahmen der arteriellen Gefäßversteifung bremst. Die Studie von Verrecchia et al. (2001) konnte außerdem zeigen, dass *SMAD3* als Transkriptionsfaktor zahlreiche Gene der Kollagensynthese reguliert, darunter *COL1A1*, *COL1A2* und *TIMP1*. Damit ließe sich erklären, wie die Regulation von *SMAD3* zu einer gesteigerten Kollagensynthese führen kann. Mithilfe weiterer qPCR-Analysen und siRNA-*Knockdown*-Experimenten ließen sich die *SMAD3* nachgeschalteten Gene und Kaskaden auf eine Regulation durch miR-146a untersuchen, und damit diese Hypothese weiter überprüfen.

Die Regulation von *PLOD2* durch miR-146a führt über die Reduzierung der LH2 mutmaßlich zu weniger Synthese von HP. Basierend auf den oben genannten Untersuchungen stellt sich die Frage, ob eine Steigerung von miR-146a auch zu einer tatsächlichen Reduzierung der HP im Gewebe oder Zellkulturmodell führt. Pyridinoline sind sehr kleine Verbindungen. Zur quantitativen Analyse dieser haben sich Messverfahren

mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) durchgesetzt (Eyre et al. 1984). Kollagenhaltiges Gewebe von Mäusen, die zuvor mit *Mimic* oder Inhibitor behandelt wurden, ließe sich mithilfe der HPLC Methode gut analysieren. Eine weitere Möglichkeit wäre ein *In-vitro*-Ansatz mit Fibroblasten oder VSMCs, die zuvor wiederum mit *Mimic* oder Inhibitor transfiziert wurden und anschließend über die HPLC auf HP untersucht werden (Van der Slot et al. 2003).

Neben den der miR-146a nachgeschalteten Mechanismen sind auch die vorgeschalteten Mechanismen interessant. Die vorliegenden Ergebnisse konnten zeigen, dass eine erhöhte Matrixsteifigkeit zu einer Hochregulation der Expression von miR-146a führt. Weitere Versuche sollten die Mechanismen untersuchen, die dieser Regulation zugrunde liegen. Denkbar ist eine Regulation von miR-146a durch die bekanntermaßen mechanosensiblen Transkriptionsfaktoren YAP oder TAZ (Dupont S et al. 2011).

4.3.2 Weitere Endpunkte

Über den vorgeschlagenen Signalweg (Abbildung 13) hinausgehend lassen sich weiterführende Endpunkte der vorliegenden Untersuchungen formulieren. Wie eingangs erläutert ist die gesteigerte Kollagensynthese und damit verbundene vaskuläre Fibrose nicht der einzige Mechanismus, der zu arterieller Gefäßversteifung führt. Zum Ungleichgewicht von Elastin und Kollagen im Gewebe trägt neben der gesteigerten Kollagensynthese auch eine gesteigerte Elastinfragmentierung bei (Wagenseil und Mecham 2009; 2012). Weitere Mechanismen sind zunehmende Kalzifikation der Extrazellulärmoleküle (Niederhoffer et al. 1997; Raaz et al. 2015b), Seneszenz der SMCs (Qiu H et al. 2010) und chronische Inflammation (Booth et al. 2004). Die Kombination aller Mechanismen lässt die Versteifung der Gefäße rasant fortschreiten und verstärkt die Gefäßalterung. Aus diesem Grund sollten weiterführende Experimente miR-146a im Kontext dieser Mechanismen untersuchen.

MiRs weisen die besondere Eigenschaft auf nicht nur ein Gen, sondern über die imperfekte Basenpaarung bei der Bindung an die mRNA gesamte Gennetzwerke regulieren zu können (Krek et al. 2005). Eine einzelne miR könnte demnach bei allen der arteriellen Gefäßversteifung zugrunde liegenden Mechanismen verschiedene Gene hemmen. Endpunkt dieser Untersuchungen könnte daher sein, miR-146a auf das Potential eines „universalen Regulators“ der altersbedingten, arteriellen Gefäßversteifung zu überprüfen.

Bezüglich der Elastinfragmentierung könnte der Einfluss von miR-146a auf das Gleichgewicht von MMPs, die für den Abbau von Elastin verantwortlich sind, und deren Gegenspielern, den TIMPs, untersucht werden (Bailey 2001). Zur vaskulären Kalzifikation tragen Mechanismen wie der Verlust an Inhibitoren der Mineralisierung oder vermehrte Anhäufung von Proteinen aus der Knochenbildung bei (Giachelli 2004). Diese könnten ebenfalls Ansatzpunkte für eine Regulation durch miR-146a bieten. Um den Einfluss von miR-146a auf die Seneszenz zu untersuchen, bieten sich sowohl β -Galaktosidase *Assays* als

auch *cyclin dependent kinase inhibitor p21* an, die beide etablierte Marker für Seneszenz im Zellmodell darstellen (Lee BY et al. 2006; Stein et al. 1999).

Sollte miR-146a in all diese Aspekte der arteriellen Gefäßversteifung involviert sein, könnte sie ein wertvolles neues Instrument in der Diagnose und Therapie der altersbedingten arteriellen Gefäßversteifung darstellen.

4.3.3 Translation der Ergebnisse

MiRs stellen seit ihrer Entdeckung eine vielversprechende und neuartige Therapieoption für komplexe Erkrankungen dar (Rupaimoole und Slack 2017). Inzwischen wurde bereits bei zahlreichen Erkrankungen spezifische miRs als Therapeutikum eingesetzt. Darüber hinausgehend werden zunehmend einzelne miRs und auch ganze miR-Cluster beschrieben, die in der Routine im Blut bestimmbar sind und zur Diagnose von komplexen Pathologien beitragen können (Wang J et al. 2016).

Erste Ansätze der Übertragung von Erkenntnissen aus der Forschung zur miR-146a in die klinische Anwendung zeigen bereits vielversprechende Ergebnisse. Morishita et al. (2015) setzten miR-146a im Tiermodell zur Behandlung von Fibrose ein. In ihrer Studie wurde mithilfe einer Ureterobstruktion eine renale Fibrose bei Mäusen erzeugt. Anschließend wurde mittels Polyethylene-Nanopartikeln gezielt miR-146a appliziert, wodurch die Ausbildung der renalen Fibrose signifikant verringert wurde.

Ein Beispiel für den diagnostischen Einsatz von miR-146a im klinischen Alltag bietet die Studie von Mortazavi-Jahromi et al. (2020), die zeigen wie miR-146a aufgrund der gut erforschten Hintergründe zu der Regulation von proinflammatorischen Genen wie *IRAK1* und *TRAF6*, sowie dem NF- κ B Signalweg durch miR-146a, als Marker für den Verlauf der rheumatoiden Arthritis etabliert werden konnte. Die Messung von miR als Marker erlaubt im Rahmen klinischer Studien eine detailliertere Einschätzung der Auswirkungen von neuartigen Medikamenten, als es mit den herkömmlichen Parametern aus quantitativen Zellanalysen und Entzündungsparametern möglich wäre. Diese Ergebnisse reihen sich in zahlreiche erfolgsversprechende Studien zu miRs auf dem Gebiet der Onkologie, Hepatologie oder Kardiologie ein (Rupaimoole und Slack 2017).

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass miR-146a-basierte Mechanismen zur Regulation der gesteigerten Kollagensynthese und vaskulären Fibrose im Kontext der arteriellen Gefäßversteifung beitragen. Diese Ergebnisse können helfen, das erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse durch die zunehmende Versteifung der Arterien im Alter in Zukunft besser einschätzen und möglicherweise therapieren zu können.

5 Zusammenfassung

Bei der altersbedingten arteriellen Gefäßversteifung kommt es aufgrund einer zunehmenden Versteifung der Aorta und der leitenden Arterien zur Belastung der Mikrozirkulation und des Herzens. Schäden in Nieren und Gehirn, Herzinsuffizienz und Veränderungen der Aorta selbst, wie Aortenaneurysmata, können die schwerwiegende Folge sein. Die arterielle Gefäßversteifung stellt daher einen eigenen kardiovaskulären Risikofaktor dar. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind vielseitig. Ein Ungleichgewicht zwischen fragmentiertem Elastin und erhöhter Mengen an Kollagen in der Extrazellulärmatrix stellen dabei einen entscheidenden Mechanismus dar.

MikroRNAs sind kleine einzelsträngige RNA-Sequenzen, die ganze Gennetzwerke regulieren können und enormes Potential für innovative Diagnostik- und Therapieansätze bieten. In der vorliegenden Arbeit wurde miR-146a näher untersucht. Ihr lag die Annahme zugrunde, dass miR-146a in steifen Geweben erhöht ist, da sie den Mechanismus der vaskulären Fibrose bremst und so protektiv als negativer Feedbackregulator im Rahmen der arteriellen Gefäßversteifung wirkt.

Mittels RNA-Extraktion und RT-qPCR wurde das Level von miR-146a in gealterten, murinen Aorten bestimmt. Außerdem wurden glatte Gefäßmuskelzellen auf unterschiedlich steifen Zellkulturplatten ausgesät und ebenfalls das Level von miR-146a gemessen. Anschließend wurden miR-146a-Modulatoren mittels Lipofektamin in glatte Gefäßmuskelzellen transfiziert und verschiedene Experimente durchgeführt: zunächst wurden die Genexpressionslevel der profibrotischen Gene *SMAD3* und *PLOD2* über RT-qPCR bestimmt und die Regulation von *PLOD2* über den Transkriptionsfaktor *SMAD3* in einem nachfolgenden Experiment mithilfe von siRNA für *SMAD3* untersucht. Weiterhin wurde ein *Scar-in-a-jar Assay* zur Bestimmung der tatsächlichen Synthese von Kollagenmolekülen durchgeführt. Dabei wurde den Zellen nach der Transfektion mit miR-146a-Modulatoren D_xS, Ascorbinsäure und TGF- β 1 hinzugefügt und anschließend die Menge an synthetisiertem Kollagen I mittels Immunfluoreszenzfärbung ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigten, dass miR-146a sowohl in alten, murinen Aorten, als auch auf steifen Zellkulturplatten signifikant hochreguliert ist. Die Gene *SMAD3* und *PLOD2* waren nach Transfektion von miR-146a-*Mimic* signifikant herunterreguliert und nach Transfektion von miR-146a-Inhibitor signifikant hochreguliert. Die Ergebnisse des Experiments mit siRNA für *SMAD3* waren hingegen nicht signifikant. Das *Scar-in-a-jar Assay* zeigte, dass der miR-146a-*Mimic* die Synthese von Kollagen vermindert und der miR-146a-Inhibitor die Synthese erhöht.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass miR-146a protektiv auf die Entstehung von vaskulärer Fibrose wirkt. Die Regulation könnte über den TGF- β 1/*SMAD3*-Signalweg und über die vermehrte Bildung von *Crosslinks* durch die LH2 und deren Gen *PLOD2* ablaufen. Die Ergebnisse bestätigen damit *SMAD3* als bereits bekanntes Zielgen von

miR-146a und schlagen *PLOD2* als neues unbekanntes Zielgen vor. Die Verifizierung von *PLOD2* als Zielgen von miR-146a und die weiterführende Untersuchung der vorgeschlagenen Signalkaskade könnte daher Gegenstandsbereich zukünftiger Forschung sein. Außerdem könnte der Einfluss von miR-146a auf die weiteren molekularen Mechanismen der arteriellen Gefäßversteifung, wie Kalzifikation, Elastinfragmentierung oder Seneszenz der glatten Gefäßmuskelzellen, untersucht werden.

Die erhobenen Daten zeigen erstmalig miR-146a als wichtigen Regulator der vaskulären Fibrose im Rahmen der altersbedingten arteriellen Gefäßversteifung. MiR-146a ist damit vielversprechender Ansatzpunkt für neuartige miR-basierte Therapieansätze der arteriellen Gefäßversteifung.

6 Anhang

6.1 Analysenzertifikat der HAoSMCs

LONZA

Certificate of Analysis

Page 1 of 2

esShop Dummy Customer DE
used in esShop only D-

Print Date: 08-Nov-2020

Product Name: AoSMC-Aortic Smooth Mus
Cells_SmGM-2_cryo amp
Material Number: CC-2571
Batch No: 0000326890
Manufacturing Date: 23-Nov-2012

<i>Test</i>	<i>RESULT</i>	<i>SPECIFICATION</i>		<i>UNIT</i>
		<i>MIN</i>	<i>MAX</i>	
Tissue Acquisition Number	25361			
DONOR CHARACTERISTICS	18 Y			
Age	MALE			
Sex	C			
Race				
VIKUS TESTING				
HBV Test	Not detected	***	***	
HBV Test	Not detected	***	***	
HCV Test	Not detected	***	***	
MICROBIAL TESTING				
Stability Test	Negative	***	***	
SECURITY TESTING				
CELL PERFORMANCE TESTING				
Cell Passage Frozen	3			
Viability	98	>= 70%	***	%
Cell Count (Cells/ml)	744000	>= 500,000	***	
Seeding Efficiency	91	>= 20%	***	%
Doubling Time (hours)	27	15	48	hrs

This kit has been reviewed by Quality Assurance in compliance with requirements of Lonza's Quality System. This document was generated from a validated Part 11 compliant electronic system and thus handwritten signatures are not required.
Lonza Walkersville Inc.
Walkersville, MD 2795 5415
Tel: (801) 888-7025
Fax: (801) 848-4024

LONZA

Certificate of Analysis

Page 2 of 2

esShop Dummy Customer DE
used in esShop only D-

Print Date: 08-Nov-2020

Product Name: AoSMC-Aortic Smooth Mus
Cells_SmGM-2_cryo amp
Material Number: CC-2571
Batch No: 0000326890
Manufacturing Date: 23-Nov-2012

Additional Information:
These cells were isolated from donated human tissue after obtaining permission for their use in research applications by the donor and the donor's family. The donor's name and other identifying information is not provided. Donor cell and media products can be downloaded from our website at www.lonza.com/cell_protocols.
In addition to the specifications listed above, the following are guaranteed for all lots of this product using Lonza's Clonetics (TM) and Poretics (TM) Media, Reagents, and Protocols: Total Population Doublings >=15, Factor VIII Negative, Alpha Smooth Muscle Actin Expression Positive.

Paul Mack
Historically signed by Paul Mack
Date: 08-Nov-2020 10:59:17 EST
RELEASE (Impression Date: 08-Nov-2020)

This kit has been reviewed by Quality Assurance in compliance with requirements of Lonza's Quality System. This document was generated from a validated Part 11 compliant electronic system and thus handwritten signatures are not required.
Lonza Walkersville Inc.
Walkersville, MD 2795 5415
Tel: (801) 888-7025
Fax: (801) 848-4024

7 Literaturverzeichnis

- Amar J, Ruidavets JB, Chamontin B, Drouet L, Ferrieres J (2001): Arterial stiffness and cardiovascular risk factors in a population-based study. *J Hypertens* 19, 381-387
- Ameres SL, Zamore PD (2013): Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 475-488
- Amin M, Le VP, Wagenseil JE (2012): Mechanical testing of mouse carotid arteries: from newborn to adult. *J Vis Exp* 60, 3373
- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB (2003): Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116, 217-224
- Bailey AJ (2001): Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev* 122, 735-755
- Bartel DP (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297
- Benetos A, Waeber B, Izzo J, Mitchell G, Resnick L, Asmar R, Safar M (2002): Influence of age, risk factors, and cardiovascular and renal disease on arterial stiffness: clinical applications. *Am J Hypertens* 15, 1101-1108
- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C (2008): The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 36, D149-153
- Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Orjalo AV, Rodier F, Lithgow GJ, Campisi J (2009): MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging (Albany NY)* 1, 402-411
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D (2004): Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-191
- Bonifacio LN, Jarstfer MB (2010): MiRNA profile associated with replicative senescence, extended cell culture, and ectopic telomerase expression in human foreskin fibroblasts. *PLoS One* 5, e12519
- Booth AD, Wallace S, McEniery CM, Yasmin, Brown J, Jayne DR, Wilkinson IB (2004): Inflammation and arterial stiffness in systemic vasculitis: a model of vascular inflammation. *Arthritis Rheum* 50, 581-588
- Brasier AR, Tate JE, Habener JF (1989): Optimized Use of the Firefly Luciferase Assay as a Reporter Gene in Mammalian-Cell Lines. *Biotechniques* 7, 1116-1122
- Briet M, Bozec E, Laurent S, Fassot C, London GM, Jacquot C, Froissart M, Houillier P, Boutouyrie P (2006): Arterial stiffness and enlargement in mild-to-moderate chronic kidney disease. *Kidney Int* 69, 350-357
- Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, McDonald JM, Chen Y (2008): Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem* 283, 15319-15327
- Callister Jr. WD, Rethwisch DG: *Materials Science and Engineering - An Introduction*. 7. Auflage; John Wiley & Sons, Inc., New York 2007

- Cattell MA, Anderson JC, Hasleton PS (1996): Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human thoracic aorta. *Clin Chim Acta* 245, 73-84
- Chen CZ, Peng YX, Wang ZB, Fish PV, Kaar JL, Koepsel RR, Russell AJ, Lareu RR, Raghunath M (2009): The Scar-in-a-Jar: studying potential antifibrotic compounds from the epigenetic to extracellular level in a single well. *Br J Pharmacol* 158, 1196-1209
- Cheung KS, Sposito N, Stumpf PS, Wilson DI, Sanchez-Elsner T, Oreffo RO (2014): MicroRNA-146a regulates human foetal femur derived skeletal stem cell differentiation by down-regulating SMAD2 and SMAD3. *PLoS One* 9, e98063
- Chirinos JA, Kips JG, Jacobs DR, Jr., Brumback L, Duprez DA, Kronmal R, Bluemke DA, Townsend RR, Vermeersch S, Segers P (2012): Arterial wave reflections and incident cardiovascular events and heart failure: MESA (Multiethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol* 60, 2170-2177
- Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M, Pilpel Y, Nielsen FC, Oren M, Lund AH (2010): p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ* 17, 236-245
- Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B (2010): Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 3, 499-506
- De Lucia C, Komici K, Borghetti G, Femminella GD, Bencivenga L, Cannavo A, Corbi G, Ferrara N, Houser SR, Koch WJ et al. (2017): microRNA in Cardiovascular Aging and Age-Related Cardiovascular Diseases. *Front Med (Lausanne)* 4, 74
- Delles C, Zimmerli LU, McGrane DJ, Koh-Tan CH, Pathi VL, McKay AJ, Steedman T, Dargie HJ, Hamilton CA, Dominiczak AF (2008): Vascular stiffness is related to superoxide generation in the vessel wall. *J Hypertens* 26, 946-955
- Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM (1998): Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 17, 3091-3100
- Dimmeler S, Nicotera P (2013): MicroRNAs in age-related diseases. *EMBO Mol Med* 5, 180-190
- Ding J, Mitchell GF, Bots ML, Sigurdsson S, Harris TB, Garcia M, Eiriksdottir G, van Buchem MA, Gudnason V, Launer LJ (2015): Carotid arterial stiffness and risk of incident cerebral microbleeds in older people: the Age, Gene/Environment Susceptibility (AGES)-Reykjavik study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 1889-1895
- DuPont JJ, Kenney RM, Patel AR, Jaffe IZ (2019): Sex differences in mechanisms of arterial stiffness. *Br J Pharmacol* 176, 4208-4225
- Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S et al. (2011): Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179-183

- El Gazzar M, Church A, Liu T, McCall CE (2011): MicroRNA-146a regulates both transcription silencing and translation disruption of TNF- α during TLR4-induced gene reprogramming. *J Leukoc Biol* 90, 509-519
- Elmadhun NY, Sabe AA, Robich MP, Chu LM, Lassaletta AD, Sellke FW (2013): The pig as a valuable model for testing the effect of resveratrol to prevent cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 1290, 130-135
- Eyre DR, Koob TJ, Van Ness KP (1984): Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 137, 380-388
- Feng B, Chen S, Gordon AD, Chakrabarti S (2017): miR-146a mediates inflammatory changes and fibrosis in the heart in diabetes. *J Mol Cell Cardiol* 105, 70-76
- Ferrari AU, Radaelli A, Centola M (2003): Invited review: aging and the cardiovascular system. *J Appl Physiol* (1985) 95, 2591-2597
- Gao M, Wang X, Zhang X, Ha T, Ma H, Liu L, Kalbfleisch JH, Gao X, Kao RL, Williams DL (2015): Attenuation of cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis by microRNA-146a is mediated via targeting of IRAK1 and TRAF6 expression. *J Immunol* 195, 672-682
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998): NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-260
- Giachelli CM (2004): Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 15, 2959-2964
- Gjaltema RA, de Rond S, Rots MG, Bank RA (2015): Procollagen lysyl hydroxylase 2 expression is regulated by an alternative downstream transforming growth factor β -1 activation mechanism. *J Biol Chem* 290, 28465-28476
- Greenwald SE (2007): Ageing of the conduit arteries. *J Pathol* 211, 157-172
- Groenewegen KA, den Ruijter HM, Pasterkamp G, Polak JF, Bots ML, Peters SA (2016): Vascular age to determine cardiovascular disease risk: A systematic review of its concepts, definitions, and clinical applications. *Eur J Prev Cardiol* 23, 264-274
- Ha M, Kim VN (2014): Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 509-524
- Hackl M, Brunner S, Fortschegger K, Schreiner C, Micutkova L, Muck C, Laschober GT, Lepperdinger G, Sampson N, Berger P et al. (2010): miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging. *Aging Cell* 9, 291-296
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN (2004): The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18, 3016-3027
- Hansen L, Taylor WR (2016): Is increased arterial stiffness a cause or consequence of atherosclerosis? *Atherosclerosis* 249, 226-227
- Harvey A, Montezano AC, Lopes RA, Rios F, Touyz RM (2016): Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Can J Cardiol* 32, 659-668
- Hata R, Senoo H (1989): L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiol* 138, 8-16

- Hernandez R, Orbay H, Cai W (2013): Molecular imaging strategies for in vivo tracking of microRNAs: a comprehensive review. *Curr Med Chem* 20, 3594-3603
- Huang Y, Crawford M, Higuera-Castro N, Nana-Sinkam P, Ghadiali SN (2012): miR-146a regulates mechanotransduction and pressure-induced inflammation in small airway epithelium. *FASEB J* 26, 3351-3364
- Hwang DW, Song IC, Lee DS, Kim S (2010): Smart magnetic fluorescent nanoparticle imaging probes to monitor microRNAs. *Small* 6, 81-88
- Isono M, Chen S, Hong SW, Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN (2002): Smad pathway is activated in the diabetic mouse kidney and Smad3 mediates TGF- β -induced fibronectin in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 1356-1365
- Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patack AK, Chen A, Zhou Y et al. (2013): Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 368, 1685-1694
- Jin L, Zhao J, Jing W, Yan S, Wang X, Xiao C, Ma B (2014): Role of miR-146a in human chondrocyte apoptosis in response to mechanical pressure injury in vitro. *Int J Mol Med* 34, 451-463
- Jonas S, Izaurralde E (2015): Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 16, 421-433
- Karras A, Haymann JP, Bozec E, Metzger M, Jacquot C, Maruani G, Houillier P, Froissart M, Stengel B, Guardiola P et al. (2012): Large artery stiffening and remodeling are independently associated with all-cause mortality and cardiovascular events in chronic kidney disease. *Hypertension* 60, 1451-1457
- Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH (2001): Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15, 2654-2659
- Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M et al. (2005): Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500
- Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M (2005): Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438, 685
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002): Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-739
- Lakatta EG (2003): Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation* 107, 490-497
- Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E (2004): TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 49, 187-198

- Lareu RR, Subramhanya KH, Peng Y, Benny P, Chen C, Wang Z, Rajagopalan R, Raghunath M (2007): Collagen matrix deposition is dramatically enhanced in vitro when crowded with charged macromolecules: the biological relevance of the excluded volume effect. *FEBS Lett* **581**, 2709-2714
- Last JA, King TE, Jr., Nerlich AG, Reiser KM (1990): Collagen cross-linking in adult patients with acute and chronic fibrotic lung disease. Molecular markers for fibrotic collagen. *Am Rev Respir Dis* **141**, 307-313
- Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, Ducimetiere P, Benetos A (2001): Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* **37**, 1236-1241
- Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H et al. (2006): Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* **27**, 2588-2605
- Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES (2006): Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187-195
- Lee RC, Ambros V (2001): An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 862-864
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**, 4051-4060
- Lescan M, Perl RM, Golombek S, Pilz M, Hann L, Yasmin M, Behring A, Keller T, Nolte A, Gruhn F et al. (2018): De Novo Synthesis of Elastin by Exogenous Delivery of Synthetic Modified mRNA into Skin and Elastin-Deficient Cells. *Mol Ther Nucleic Acids* **11**, 475-484
- Li J, Huang J, Dai L, Yu D, Chen Q, Zhang X, Dai K (2012): miR-146a, an IL-1 β responsive miRNA, induces vascular endothelial growth factor and chondrocyte apoptosis by targeting Smad4. *Arthritis Res Ther* **14**, R75
- Li W, Zhou BR, Hua LJ, Guo Z, Luo D (2013): Differential miRNA profile on photoaged primary human fibroblasts irradiated with ultraviolet A. *Tumour Biol* **34**, 3491-3500
- Liu Z, Lu CL, Cui LP, Hu YL, Yu Q, Jiang Y, Ma T, Jiao DK, Wang D, Jia CY (2012): MicroRNA-146a modulates TGF- β 1-induced phenotypic differentiation in human dermal fibroblasts by targeting SMAD4. *Arch Dermatol Res* **304**, 195-202
- Lyle AN, Raaz U (2017): Killing Me Unsoftly: Causes and Mechanisms of Arterial Stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **37**, e1-e11
- Mahmud A, Feely J (2003): Effect of smoking on arterial stiffness and pulse pressure amplification. *Hypertension* **41**, 183-187
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, 563-574

- Massague J, Seoane J, Wotton D (2005): Smad transcription factors. *Genes Dev* 19, 2783-2810
- Mathur AB, Collinsworth AM, Reichert WM, Kraus WE, Truskey GA (2001): Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *J Biomech* 34, 1545-1553
- Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Hofman A, van Popele NM, Bos ML, Schalekamp MA, Asmar R, Reneman RS, Hoeks AP, Breteler MM et al. (2006): Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* 113, 657-663
- Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, Benjamin EJ (2010): Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. *Circulation* 121, 505-511
- Morishita Y, Imai T, Yoshizawa H, Watanabe M, Ishibashi K, Muto S, Nagata D (2015): Delivery of microRNA-146a with polyethylenimine nanoparticles inhibits renal fibrosis in vivo. *Int J Nanomedicine* 10, 3475-3488
- Mortazavi-Jahromi SS, Ahmadzadeh A, Rezaieyazdi Z, Aslani M, Omidian S, Mirshafiey A (2020): The role of β -d-mannuronic acid, as a new non-steroidal anti-inflammatory drug on expression of miR-146a, IRAK1, TRAF6, NF- κ B and pro-inflammatory cytokines following a clinical trial in rheumatoid arthritis patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 42, 228-236
- Nahid MA, Satoh M, Chan EK (2011): MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol* 8, 388-403
- Nanoudis S, Pikilidou M, Yavropoulou M, Zebekakis P (2017): The Role of MicroRNAs in Arterial Stiffness and Arterial Calcification. An Update and Review of the Literature. *Front Genet* 8, 209
- Nichols WW, McDonald DA (1972): Wave-velocity in the proximal aorta. *Med Biol Eng* 10, 327-335
- Niederhoffer N, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Duvivier C, Peslin R, Atkinson J (1997): Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. *Hypertension* 29, 999-1006
- O'Rourke MF, Hashimoto J (2007): Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol* 50, 1-13
- Olivieri F, Lazzarini R, Recchioni R, Marcheselli F, Rippo MR, Di Nuzzo S, Albertini MC, Graciotti L, Babini L, Mariotti S et al. (2013): MiR-146a as marker of senescence-associated pro-inflammatory status in cells involved in vascular remodelling. *Age (Dordr)* 35, 1157-1172
- Palombo C, Kozakova M (2016): Arterial stiffness, atherosclerosis and cardiovascular risk: Pathophysiologic mechanisms and emerging clinical indications. *Vascul Pharmacol* 77, 1-7
- Palta P, Sharrett AR, Wei J, Meyer ML, Kucharska-Newton A, Power MC, Deal JA, Jack CR, Knopman D, Wright J et al. (2019): Central Arterial Stiffness Is Associated With Structural Brain Damage and Poorer Cognitive Performance: The ARIC Study. *J Am Heart Assoc* 8, e011045

- Poels MM, Zaccai K, Verwoert GC, Vernooij MW, Hofman A, van der Lugt A, Witteman JC, Breteler MM, Mattace-Raso FU, Ikram MA (2012): Arterial stiffness and cerebral small vessel disease: the Rotterdam Scan Study. *Stroke* 43, 2637-2642
- Prakash A, Adlakha H, Rabideau N, Hass CJ, Morris SA, Geva T, Gauvreau K, Singh MN, Lacro RV (2015): Segmental Aortic Stiffness in Children and Young Adults With Connective Tissue Disorders: Relationships With Age, Aortic Size, Rate of Dilation, and Surgical Root Replacement. *Circulation* 132, 595-602
- Qiu H, Zhu Y, Sun Z, Trzeciakowski JP, Gansner M, Depre C, Resuello RR, Natividad FF, Hunter WC, Genin GM et al. (2010): Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. *Circ Res* 107, 615-619
- Qiu M, Li T, Wang B, Gong H, Huang T (2020): miR-146a-5p Regulated Cell Proliferation and Apoptosis by Targeting SMAD3 and SMAD4. *Protein Pept Lett* 27, 411-418
- Raaz U, Zollner AM, Schellinger IN, Toh R, Nakagami F, Brandt M, Emrich FC, Kayama Y, Eken S, Adam M et al. (2015a): Segmental aortic stiffening contributes to experimental abdominal aortic aneurysm development. *Circulation* 131, 1783-1795
- Raaz U, Schellinger IN, Chernogubova E, Warnecke C, Kayama Y, Penov K, Hennigs JK, Salomons F, Eken S, Emrich FC et al. (2015b): Transcription Factor Runx2 Promotes Aortic Fibrosis and Stiffness in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circ Res* 117, 513-524
- Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, Oksala N, Mennander A, Tarkka M, Klopp N, Illig T, Kahonen M, Karhunen PJ et al. (2011): miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* 219, 211-217
- Rezvan A, Rooney K, Al Mheid I, Ghasemzadeh N, Jo H, Quyyumi AA, Searles CD (2014): Circulating miR-146a Shows Positive Correlation with Arterial Stiffness and Negative Correlation with Aerobic Exercise Capacity Among Healthy Adults. *Circulation* 130, A19721
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH et al. (1986): Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4167-4171
- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Egidio J (2003): Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep* 5, 73-79
- Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egidio J (2007): TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* 74, 196-206
- Rupaimoole R, Slack FJ (2017): MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 16, 203-222
- Rusca N, Monticelli S (2011): MiR-146a in Immunity and Disease. *Mol Biol Int* 2011, 437301
- Safar ME, Lacolley P (2007): Disturbance of macro- and microcirculation: relations with pulse pressure and cardiac organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H1-7

- Safar ME, Thomas F, Blacher J, Nzietchueng R, Bureau JM, Pannier B, Benetos A (2006): Metabolic syndrome and age-related progression of aortic stiffness. *J Am Coll Cardiol* **47**, 72-75
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491
- Schellinger IN, Mattern K, Raaz U (2019): The Hardest Part. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **39**, 1301-1306
- Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V (1999): Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* **19**, 2109-2117
- Steppan J, Barodka V, Berkowitz DE, Nyhan D (2011): Vascular stiffness and increased pulse pressure in the aging cardiovascular system. *Cardiol Res Pract* **2011**, 263585
- Sun Y, Li Y, Wang H, Li H, Liu S, Chen J, Ying H (2017): miR-146a-5p acts as a negative regulator of TGF- β signaling in skeletal muscle after acute contusion. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **49**, 628-634
- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D (2006): NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12481-12486
- Takaluoma K, Lantto J, Myllyharju J (2007): Lysyl hydroxylase 2 is a specific telopeptide hydroxylase, while all three isoenzymes hydroxylate collagenous sequences. *Matrix Biol* **26**, 396-403
- Taylor Z, Miller K (2004): Reassessment of brain elasticity for analysis of biomechanisms of hydrocephalus. *J Biomech* **37**, 1263-1269
- Tsao CW, Lyass A, Larson MG, Levy D, Hamburg NM, Vita JA, Benjamin EJ, Mitchell GF, Vasan RS (2015): Relation of Central Arterial Stiffness to Incident Heart Failure in the Community. *J Am Heart Assoc* **4**, e002189
- Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A (2010): Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**, 1028-1041
- Uzawa K, Marshall MK, Katz EP, Tanzawa H, Yeowell HN, Yamauchi M (1998): Altered posttranslational modifications of collagen in keloid. *Biochem Biophys Res Commun* **249**, 652-655
- Van der Slot AJ, Zuurmond AM, Bardoel AF, Wijmenga C, Pruijs HE, Silence DO, Brinckmann J, Abraham DJ, Black CM, Verzijl N et al. (2003): Identification of PLOD2 as telopeptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis. *J Biol Chem* **278**, 40967-40972
- Van der Slot AJ, Zuurmond AM, Van Den Bogaardt AJ, Ulrich MMW, Middelkoop E, Boers W, Runday HK, DeGroot J, Huizinga TWJ, Bank RA (2004): Increased formation of pyridinoline cross-links due to higher telopeptide lysyl hydroxylase levels is a general fibrotic phenomenon. *Matrix Biol* **23**, 251-257

- Van der Slot-Verhoeven AJ, Van Dura EA, Attema J, Blauw B, Degroot J, Huizinga TW, Zuurmond AM, Bank RA (2005): The type of collagen cross-link determines the reversibility of experimental skin fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1740, 60-67
- Van Doren SR (2015): Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol* 44-46, 224-231
- Van Rooij E, Purcell AL, Levin AA (2012): Developing microRNA therapeutics. *Circ Res* 110, 496-507
- Vasa-Nicotera M, Chen H, Tucci P, Yang AL, Saintigny G, Menghini R, Mahe C, Agostini M, Knight RA, Melino G et al. (2011): miR-146a is modulated in human endothelial cell with aging. *Atherosclerosis* 217, 326-330
- Verrecchia F, Mauviel A (2002): Transforming growth factor- β signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 118, 211-215
- Verrecchia F, Chu M-L, Mauviel A (2001): Identification of novel TGF- β /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 276, 17058-17062
- Vlachopoulos C, O'Rourke MF, Nichols WW: McDonald's blood flow in arteries: theoretical, experimental and clinical principles. 6. Auflage; CRC press, Boca Raton 2011
- Vuorio E, de Crombrughe B (1990): The family of collagen genes. *Annu Rev Biochem* 59, 837-872
- Wagenseil JE, Mecham RP (2009): Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 89, 957-989
- Wagenseil JE, Mecham RP (2012): Elastin in large artery stiffness and hypertension. *J Cardiovasc Transl Res* 5, 264-273
- Wang J, Chen JY, Sen S (2016): MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol* 231, 25-30
- Wang M, Zhao D, Spinetti G, Zhang J, Jiang LQ, Pintus G, Monticone R, Lakatta EG (2006): Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1503-1509
- Wang M, Zhang J, Jiang LQ, Spinetti G, Pintus G, Monticone R, Kolodgie FD, Virmani R, Lakatta EG (2007): Proinflammatory profile within the grossly normal aged human aortic wall. *Hypertension* 50, 219-227
- Wang W, Huang XR, Canlas E, Oka K, Truong LD, Deng C, Bhowmick NA, Ju W, Bottinger EP, Lan HY (2006): Essential role of Smad3 in angiotensin II-induced vascular fibrosis. *Circ Res* 98, 1032-1039
- Welsch U, Kummer W, Deller T (Hrsg.): Histologie - Das Lehrbuch, Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie 5. Auflage; Urban & Fischer, München 2018

- Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N: European cardiovascular disease statistics 2017. 1. Auflage; European Heart Network AISBL, Brüssel 2017
- Wynn TA (2008): Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214, 199-210
- Xiao B, Zhu ED, Li N, Lu DS, Li W, Li BS, Zhao YL, Mao XH, Guo G, Yu PW et al. (2012): Increased miR-146a in gastric cancer directly targets SMAD4 and is involved in modulating cell proliferation and apoptosis. *Oncol Rep* 27, 559-566
- Yamauchi M, Sricholpech M (2012): Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem* 52, 113-133
- Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, Ashby MJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB (2005): Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 372
- Zou Y, Cai Y, Lu D, Zhou Y, Yao Q, Zhang S (2017): MicroRNA-146a-5p attenuates liver fibrosis by suppressing profibrogenic effects of TGFbeta1 and lipopolysaccharide. *Cell Signal* 39, 1-8

Danksagung

Ich danke PD Dr. Uwe Raaz zunächst für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und die Möglichkeit Teil seiner Arbeitsgruppe zu werden. Außerdem danke ich ihm für die enge wissenschaftliche und persönliche Zusammenarbeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit und Fähigkeiten, und die unermüdliche Unterstützung und Betreuung.

Ebenso danke ich Dr. Isabel Schellinger für ihre exzellente und aufopfernde Betreuung über die gesamte Zeit meiner Promotion. Außerdem möchte ich mich bei ihr ausdrücklich für alles, was ich von ihr über die Forschung und das Leben lernen durfte, bedanken.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Philip S. Tsao für seine Unterstützung während meiner Zeit in seiner Arbeitsgruppe an der Stanford Medical School.

Ich danke außerdem dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK) für die Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit in Form eines sechsmonatigen Promotionsstipendiums.

Desweiteren danke ich Dr. Joanna Jakubizka-Smorag, Dr. Giriprakash Chodisetti, Lena Mattes, Anne Petzold, Angelika Dannert und Kristina Kromer für den einzigartigen Teamgeist und ihre Unterstützung während unserer Zeit im Labor.

Nicht zuletzt danke ich Anke Mattern, Hendrika Wiedemann und Dr. Svante Gersch für all die wertvollen Anmerkungen und Kommentare zu meinem Manuskript.

Lebenslauf