

Aus der  
Klinik für Anaesthesiologie  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Bernhard Zwißler

**Vergleich von microRNA-Expressionsprofilen aus Blut- und Serumproben und dem arteriosklerotischen Risikoprofil bei Patienten mit arteriosklerotisch bedingten Erkrankungsbildern**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Alexander Doege

aus  
Wilhelmshaven

Jahr  
2026

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Gustav Schelling  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Reinhard Lorenz

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Florian Brandes

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2026

# 1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis.....	1
2.	Zusammenfassung.....	4
3.	Abstract.....	7
4.	Abkürzungsverzeichnis.....	8
5.	Abbildungsverzeichnis.....	9
6.	Tabellenverzeichnis.....	11
7.	Einleitung.....	13
7.1	Arteriosklerose & Atherosklerose – eine kurze Definition.....	13
7.2	Epidemiologie & Manifestation der Arteriosklerose.....	16
7.3	Pathogenese der Arteriosklerose.....	18
7.4	Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK).....	21
7.5	Die koronare Herzerkrankung (KHK).....	23
7.6	Die Karotisstenose.....	24
7.7	Bauchaortenaneurysma.....	25
7.8	RNA.....	26
7.9	Micro-RNA (miRNA).....	28
7.10	miRNAs und Arteriosklerose – ein aktueller Stand.....	31
7.11	Ziel der Arbeit.....	32
8.	Material und Methoden.....	33
8.1	Studiendesign.....	33
8.2	Ethikvotum.....	33

8.3	Patientenauswahl & Patientenidentifikation .....	34
8.4	Probenentnahme & Probenweiterverarbeitung.....	36
8.4.1	Präinterventionelle Blutentnahme .....	36
8.4.2	Verarbeitung der Blutproben .....	36
8.5	Extraktion der zu untersuchenden Blutbestandteile .....	37
8.5.1	Extraktion der Exosomen .....	37
8.5.2	Qualitätskontrolle der extrahierten Proteine .....	38
8.5.3	Extraktion der RNA aus den Serumproben.....	39
8.5.4	Extraktion der RNA aus den Blutzellen .....	39
8.5.5	Hochdurchsatz-Sequenzierung .....	40
8.6	Datenanalyse und Datenauswertung .....	41
8.6.1	Bioinformatische Analyse .....	41
8.6.2	Analyse der Genexpression .....	41
8.6.3	Statistische Auswertung der Patientendaten.....	42
9.	Ergebnisse .....	43
9.1	Demographie der Gesamtpopulation.....	43
9.2	Untersuchung der Risikofaktoren der Patienten .....	46
9.2.1	Arterielle Hypertonie.....	46
9.2.2	Diabetes mellitus.....	47
9.2.3	Nikotinabusus .....	47
9.2.4	Body Mass Index.....	48

---

9.2.5	Die Risikofaktoren innerhalb der Subgruppen.....	51
9.2.6	Kardiovaskuläre Risikofaktoren der Patientengruppen .....	54
9.3	Sequenzierung der Patienten-Serumproben.....	56
9.4	Vergleich der miRNA-Expressionsmuster zwischen der Kontrollgruppe und Patienten mit einer arteriosklerotischen Erkrankung .....	57
9.5	Differenzielle Expressionsanalyse als primärer Auswertungsansatz.....	63
9.6	Einordnung der Mittelwertanalysen als ergänzende Zusatzanalyse.....	63
10.	Diskussion.....	68
10.1	Kritisches Reassessment des Studiendesigns und der Methodik .....	68
10.2	Diskussion der anamnestischen Parameter.....	72
10.3	Diskussion der miRNA-Expressionsprofile .....	74
10.4	Kritische Hinterfragung des Studiendesigns.....	80
11.	Danksagung.....	82
12.	Eidesstattliche Versicherung.....	83
13.	Erklärung zur Übereinstimmung .....	84
14.	References.....	85

## 2. Zusammenfassung

Der Begriff „Arteriosklerose“ steht für eine multifaktorielle, systemische Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems. Sie ist eine der Hauptursachen für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen und zählt bis heute weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Es handelt sich dabei um einen chronisch-entzündlichen Prozess, der über einen langen Zeitraum unbemerkt abläuft und mit einer zunehmenden Einengung des Gefäßlumens, sowie einem vermehrten Integritätsverlust der Gefäßwand einhergeht. Folge sind unterschiedliche Krankheitsbilder, die als arteriosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen bezeichnet werden. Begründet in dem zunehmend progredienten Verlauf der Erkrankung und der erst späten klinischen Manifestation ist eine Früherkennung im klinischen Alltag von immenser Bedeutung.

Aufgrund dessen wurde in dieser Studie die Expression von microRNAs bei unterschiedlichen kardiovaskulären Krankheitsbildern untersucht. Die miRNA-Forschung ist vor allem in den letzten Jahren immer weiter in den wissenschaftlichen Fokus gerückt. Es handelt sich bei miRNAs um nicht-codierende RNA. Sie modulieren auf zellulärer Ebene die Expression genetischer Informationen und nehmen damit nachweislich Einfluss auf Regulationsmechanismen für Prozesse der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und den Stoffwechsel. Damit gilt die miRNA als wichtiger potenzieller Marker für Therapie und zur Überwachung von Krankheitsverläufen. Für arteriosklerotische Krankheitsbilder sind spezifische miRNA-Profile und ihr Potential als Biomarker bis dato wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war die Erfassung von spezifischen miRNA-Mustern und/oder spezifischen miRNAs als Biomarker für durch Arteriosklerose hervorgerufene Krankheiten. Zusätzlich wurde nach einem erkennbaren Zusammenhang zwischen der miRNA-Expriemierung und der erhobenen kardiovaskulären Risikofaktoren gesucht.

Folgende vier Krankheitsbilder wurden in dieser Studie eingeschlossen: Bauchaortenaneurysma (n = 35), koronare Herzerkrankung (n = 35), Karotisstenose (n = 28) und die periphere, arterielle Verschlusskrankheit (n = 36). Zusätzlich wurden 32 gesunde Patienten für eine Kontrollgruppe rekrutiert.

Zur Studienaufnahme erfolgte neben einem Anamnesegespräch zur Erfassung des kardiovaskulären Risikoprofils eine ausführliche Aufklärung der Patienten und abschließend eine venöse Blutentnahme. Die Isolation der miRNAs erfolgte aus den Serumproben der Patienten. Die Aufbereitung und Extraktion der miRNAs erfolgte in bereits erfolgreich etablierten Arbeitsmethoden und -schritten.

Gruppenübergreifend konnten beim Vergleich der Expressionsmuster zwischen den Patientengruppen und der Kontrollgruppe 27 unterschiedlich regulierte miRNAs mit einem signifikanten Expressionsunterschied gefunden werden. Besonders auffällig war die veränderte Expression der beiden miRNAs **hsa-miR-193a-5p** und **hsa-miR-320d**. Beide miRNAs waren in allen vier untersuchten arteriosklerotischen Erkrankungsgruppen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant verändert exprimiert. Mittels Überlappungsanalyse konnten zudem krankheitsspezifische miRNAs identifiziert werden. Es zeigt sich, dass die miRNAs **miR-122-5p**, **miR-2110** und **miR-483-5p** ausschließlich bei Patienten mit einem abdominellen Aneurysma vorkommen. Die miRNAs **miR-335-3p**, **miR-381-3p**, **miR-493-5p** und **miR-654-3p** wurden spezifisch bei Patienten mit einer Carotisstenose und die miRNAs **miR-370-3p** und **miR-409-3p** bei Patienten mit einer KHK gefunden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die miRNAs **miR-199a-5p**, **miR-215-5p**, **miR-3168**, **miR-582-3p** und **miR-769-5p** ausschließlich bei Patienten mit einer pAVK vorhanden sind.

Die Literaturrecherche zu den detektierten spezifischen miRNAs hat gezeigt, dass einige dieser miRNAs bereits in anderen Studien mit Arteriosklerose in Zusammenhang gebracht werden konnten. Dies unterstreicht die Validität der Ergebnisse. Entgegen den Erwartungen hat der

Vergleich der anamnestisch erhobenen Populationsmerkmalen, dem arteriosklerotischen Risikoprofil und der vorliegenden miRNA-Expression keine neuen Aufschlüsse erbracht.

Dabei wurden sowohl einzelne arteriosklerotisch relevante Risikofaktoren (gemäß der PROCAM-Studie), als auch das Auftreten von Populationsmerkmalen und Risikofaktoren im Cluster untersucht, da bekanntlich vor allem das gemeinsame Auftreten der Risikofaktoren als Cluster das Risiko für arteriosklerotische Prozesse potenziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit gruppenspezifische miRNAs detektiert werden konnten. In weiterführenden Analysen gilt es nun die Relevanz und den Einfluss der detektierten miRNAs auf die biologischen Prozesse im Rahmen der Arteriosklerose zu untersuchen und zu verstehen. Die miRNA-Forschung für das Krankheitsbild der Arteriosklerose kann die Basis für die Entwicklung eines neuen, diagnostischem Testverfahrens zur individuellen Risikoabschätzung für die Entwicklung von Arteriosklerose sein. Bis so ein Verfahren entwickelt werden kann, bedarf es jedoch noch weiterer Erkenntnisse im Bereich der miRNA-Forschung im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Arteriosklerose.

### 3. Abstract

Atherosclerosis is a multifactorial, systemic disease of the arterial system and a leading cause of cardiovascular diseases worldwide. It progresses silently over time, characterized by inflammation, narrowing of blood vessels, and weakening of the vessel walls, ultimately leading to various clinical conditions. Early detection is crucial for effective management. This study investigates the expression of microRNAs (miRNAs), non-coding RNA molecules that regulate gene expression and influence cellular processes, as potential biomarkers for atherosclerosis-related diseases. Serum samples from patients with abdominal aortic aneurysm, coronary artery disease, carotid stenosis, and peripheral arterial disease, alongside healthy controls, were analyzed. Twenty-seven miRNAs showed significant differential expression between patient and control groups, with specific miRNAs associated with particular diseases. Notably, some of these miRNAs have been previously linked to atherosclerosis, supporting their relevance. No correlation was found between miRNA expression and traditional risk factors. These findings suggest that disease-specific miRNA profiles could serve as novel biomarkers for early diagnosis and risk assessment, warranting further research into their biological roles and clinical applications.

## 4. Abkürzungsverzeichnis

AGO 2.....	Argonautproteins 2
BMI.....	Body-Mass-Index
bzw.....	beziehungsweise
CCS.....	Canadien Cardiovascular Society
CT.....	Computertomographie
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
ECV.....	extrazelluläre Vesikel
GTP.....	Guanintriphosphat
HDL.....	high density lipoprotein
ICC.....	Charlson Comorbidity Index
KHK.....	Koronare Herzkrankheit
LDL.....	Low-Density-Lipoprotein
MRE.....	miRNA Recognition Element
mRNA.....	messenger RNA
MRT.....	Magnetresonanztomograph
NO.....	Stickstoffmonoxid
PBS.....	Phosphat-gepufferte-Salzlösung
PRC.....	PaxGene RNA Spin Column
pre-miRNA.....	precursor miRNA, Vorläufer-miRNA
pri-miRNA.....	primäre miRNA
PTA.....	perkutane Angioplastie
RCA.....	Arteria coronaria dextra
RCX.....	Ramus circumflexus
RF.....	Risikofaktor, Risikofaktor
RISC.....	RNA-Induced-Silencing-Complex
RIVA.....	Ramus interventricularis anterior
RNA.....	Ribonukleinsäure
rRNA.....	ribosomale RNA
TEA.....	Thromendarteriektomie
TIA.....	Transitorische ischämische Attacke
tRNA.....	transfer RNA
UTR.....	nicht-translatierbarer Bereich
WHO.....	World Health Organisation
z.B.....	zum Beispiel

## 5. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> - Schematische Darstellung der physiologischen (oben) und pathologischen (unten) Strömungsverhältnisse sowie vier wichtige Risikofaktoren für die Ausbildung von Arteriosklerose. <sup>17</sup> .....	19
<b>Abbildung 2</b> – Dargestellt ist hier der Prozessweg bei der Herstellung einer miRNA. Aus der durch Transkription entstandenen pri-miRNA wird durch das Enzym DROSHA eine haarnadelartige Struktur herausgeschnitten. Es entsteht die Vorläufer-miRNA. Nach dem Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma erfolgte die Aufteilung der Vorläufer-miRNA in zwei Einzelstränge durch das Enzym DICER. Beide Stränge werden durch den RISC gebunden, wobei ein Strang als reife miRNA fungiert und der zweite Strang abgebaut wird. <sup>31</sup> .....	30
<b>Abbildung 3</b> – Anzahl der Patienten mit dem Risikofaktor "arterielle Hypertonie" zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses. ....	46
<b>Abbildung 4</b> – Anzahl der Patienten mit dem Risikofaktor „Diabetes mellitus“ zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses. ....	47
<b>Abbildung 5</b> – Anzahl der Patienten mit dem Risikofaktor „Nikotinabusus“ zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses. Hier erfolgte keine Differenzierung zwischen einem aktiven oder nicht-aktivem Nikotinabusus. ....	48
<b>Abbildung 6</b> – BMI-Mittelwerte der untersuchten Patientengruppen. ....	48
<b>Abbildung 7</b> – Anteil der Patienten in % mit den untersuchten Risikofaktoren innerhalb der BAA-Patientengruppe. ....	49
<b>Abbildung 8</b> – Anteil der Patienten in % mit den untersuchten Risikofaktoren innerhalb der pAVK-Patientengruppe. ....	50
<b>Abbildung 9</b> – Anteil der Patienten in % mit den untersuchten Risikofaktoren innerhalb der KHK-Patientengruppe.....	51

<b>Abbildung 10</b> – Anteil der Patienten in % mit den untersuchten Risikofaktoren innerhalb der Karotisstenosen-Patientengruppe. ....	51
<b>Abbildung 11</b> – Summation der vorliegenden Risikofaktoren (RF) des gesamten Patientenkollektivs. ....	52
<b>Abbildung 12</b> – Häufung der vorliegenden Risikofaktoren (RF) in jeder einzelnen Patientengruppe. ....	53
<b>Abbildung 13</b> – Grafische Darstellung der log <sub>2</sub> FC-Werte der gefilterten miRNAs. Dargestellt sind hier die Unterschiede zwischen allen Erkrankungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. <sup>47</sup> ....	59
<b>Abbildung 14</b> – Venn-Diagramm als Ergebnis der Überlappungsanalyse. <sup>47</sup> ....	60
<b>Abbildung 15</b> - Mittelwertanalyse für die Expression der miR-193a-5p mit Bezug auf die erhobenen Risikofaktoren – inkl. Standardfehler. RF $\geq 3$ : Anzahl von 3 oder mehr gleichzeitig vorliegenden Risikofaktoren. ....	64
<b>Abbildung 16</b> - Mittelwertanalyse für die Expression der miR-320d mit Bezug auf die erhobenen Risikofaktoren – inkl. Standardfehler. RF $\geq 3$ : Anzahl von 3 oder mehr gleichzeitig vorliegender Risikofaktoren. ....	65

## 6. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> – Stadieneinteilung der pAVK nach Fontaine.....	22
<b>Tabelle 2</b> – Übersicht zu demographischen Daten aller Patienten mit einer arteriosklerotischen Erkrankung.....	44
<b>Tabelle 3</b> – Erkrankungsübersicht aller Arteriosklerose-Patienten. Bei Patienten mit mehreren arteriosklerotischen Manifestationen hatte die Erkrankung in der Vorgeschichte schon einmal eine Rolle gespielt, trug aber nicht zum aktuellen Aufenthalt bei.....	45
<b>Tabelle 4</b> – Zusammenfassung der verwendeten Proben vor und nach der Entfernung von Proben unterhalb des Schwellenwertes. <sup>47</sup> .....	54
<b>Tabelle 5</b> – DEG mit gefilterten Cut-offs. Vergleich zwischen Gruppe Arteriosklerose vs. Kontrollgruppe. MW = Mittelwert. <sup>47</sup> .....	56
<b>Tabelle 6</b> – Gruppenspezifisch exprimierte miRNAs. Hier im Vergleich BAA zu der Kontrollgruppe. <sup>47</sup> .....	57
<b>Tabelle 7</b> – Gruppenspezifisch exprimierte miRNAs. Hier im Vergleich KHK zu der Kontrollgruppe. <sup>47</sup> .....	58
<b>Tabelle 8</b> – Gruppenspezifisch exprimierte miRNAs. Hier im Vergleich Karotisstenose zu der Kontrollgruppe. <sup>47</sup> .....	58
<b>Tabelle 9</b> – Gruppenspezifisch exprimierte miRNAs. Hier im Vergleich pAVK zu der Kontrollgruppe. <sup>47</sup> .....	59
<b>Tabelle 10</b> – p-Werte der t-test-Statistik beim Vergleich der miRNA-Expression der miRNA-193a-5p zwischen den Patienten mit vorhandenem Risikofaktor und ohne vorhandenen Risikofaktor. ....	64
<b>Tabelle 11</b> – p-Werte der t-test-Statistik bei den Vergleichen der miRNA-Expression für die miR-320d in Bezug auf die erhobenen Risikofaktoren. ....	65

**Tabelle 12** - Unterschiedlich exprimierte miRNAs zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nach Anwendung der oben genannten Filterkriterien. Hervorgehoben sind die miRNAs, die entweder in vier Subgruppen oder nur in einer einzelnen Gruppe nachgewiesen werden konnten. .... 72

## 7. Einleitung

### 7.1 Arteriosklerose & Atherosklerose – eine kurze Definition

Häufig werden vor allem im klinischen Alltag die Begriffe der Arteriosklerose und Atherosklerose gleichgesetzt. Deswegen ist es zunächst einmal wichtig, die Begriffe klar voneinander zu trennen und das Erkrankungsbild der Arteriosklerose genauer zu betrachten.

Das Wort „**Arteriosklerose**“ beschreibt allgemein gesprochen die generelle Verhärtung bzw. Versteifung von arteriellen Gefäßen. Auslöser ist dabei ein Elastizitätsverlust der Gefäße, welcher durch den Ablauf verschiedener, pathobiologischer Prozesse bedingt ist. Damit ist der Begriff „Arteriosklerose“ in erster Linie ein Sammelbegriff für eine Gruppe von Erkrankungen arteriellen Gefäßsystems. <sup>1</sup>

Man unterscheidet auf pathologischer Ebene die Mediaverkalkung vom Typ Mönckeberg („Mönckeberg-Sklerose“), die Arteriolosklerose und eben die Atherosklerose. Letztere ist am häufigsten anzutreffen und hat von den genannten Erkrankungsbildern die größte klinische Bedeutung. <sup>1</sup>

Bei der **Mediasklerose nach Mönckeberg** handelt es sich vor allem um Kalkablagerungen in der mittleren Wandschicht der Gefäße – der Tunica media. Dabei ist die Größe der betroffenen Gefäße nicht ausschlaggebend für den Befall und es können sowohl kleinere Gefäße und Arteriolen als auch größere Arterien betroffen sein. Die hier zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen sind noch nicht vollständig erschlossen. Allerdings spielen das gemeinsame Auftreten von Hypokalziämie, Hyperphosphatämie und eine verminderte Parathormon-Aktivität eine wichtige Rolle. <sup>2</sup>

Bei der **Arteriolosklerose** handelt es sich um eine Verdickung kleinerer Arterien und Arteriolen. Histopathologisch lassen sich zwei Formen unterscheiden – die hyaline Arteriolosklerose und die hyperplastische Arteriolosklerose. <sup>3</sup>

Die **Atherosklerose** ist eine sich langsam entwickelnde, chronisch-entzündlich fortschreitende Erkrankung der innersten Schicht des Gefäßsystems – der Intima. Betroffen sind dabei vor allem mittlere und große arterielle Gefäße. Es kommt zu einer Verdickung der Intima durch fibröse Einlagerungen. Wichtige pathologische Faktoren sind dabei Endothelschäden bedingt durch Infiltration von Entzündungszellen, Zellproliferationen und Apoptose. Folglich kommt es zu einer zunehmenden Einengung des Gefäßlumens oder zu einem wachsenden Integritätsverlust der Gefäßwand. Hierdurch steigt die Gefahr für eine Thrombusbildung oder für Gefäßwandschäden mit vermehrter Blutungsneigung wie beispielweise bei Aneurysmen. Atherosklerose verläuft typischerweise über einen langen Zeitraum vollkommen symptomfrei. Mit zunehmender Progression kommt es meist erst nach einigen Jahren zu den klassischen Folgeerkrankungen, die man unter dem Begriff atherosklerotisch bedingte Erkrankungen zusammenfasst. <sup>4</sup>

Vor allem in den westlichen Industrienationen sind kardiovaskuläre Erkrankungen für einen Großteil aller Todesfälle verantwortlich. <sup>5</sup> Über die Ursachen wird bis heute trotz intensiver Forschungen ausgiebig diskutiert. Derzeit wird davon ausgegangen, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse und Faktoren einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung und den Krankheitsverlauf haben. Die PROCAM-Studie benennt dabei folgende wichtige kardiovaskuläre Risikofaktoren: <sup>6</sup>

- Männliches Geschlecht
- Höheres Lebensalter
- Hohe LDL-Cholesterin-Konzentrationen im Blut
- Tabakrauchen
- Erniedrigtes HDL-Cholesterin im Blut
- Arterielle Hypertonie
- Positive Familienanamnese für arteriosklerotische Erkrankungen

Weitere Risikofaktoren:

- Erhöhte Lipoprotein-A-Konzentrationen im Blut
- Übergewicht / erhöhtes Taille-Hüft-Verhältnis
- Ungesunder Lebensstil / Energie- und fettreiche Ernährung
- Stress
- Konstitutionelle Faktoren (z.B. Depression)
- Umweltfaktoren (z.B. nächtlicher Lärm, Feinstaubbelastungen)

Die Kombination der oben benannten Risikofaktoren spielt im klinischen Alltag eine wichtige Rolle. Eine typische Häufung spezieller Risikofaktoren wird heute als „metabolisches Syndrom“ bezeichnet.<sup>7</sup>

Dazu gehören:

- Abdominelle Fettleibigkeit
- Arterielle Hypertonie
- Fettstoffwechselstörung mit Hypertriglyzeridämie
- Erniedrigtes HDL-Cholesterin
- Insulinresistenz bzw. gestörte Glucosetoleranz

## 7.2 Epidemiologie & Manifestation der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose zählt bis heute zu den häufigsten Todesursachen. Vor allem ischämische Erkrankungen des Herzens (KHK, Herzinfarkt) sind für 16% aller weltweiten Todesfälle verantwortlich. Seit dem Jahr 2000 verzeichnete die WHO (World Health Organisation) dabei einen stetigen Anstieg der Todeszahlen durch kardiovaskuläre Erkrankungen. <sup>5,8</sup>

Eine Umfrage mit über 3,6 Millionen Probanden aus den USA belegte, dass arteriosklerotisch bedingte Veränderungen mit steigendem Lebensalter zunehmen. Auch in dieser bezog man sich auf drei häufige arteriosklerotisch bedingte Erkrankungsbilder: die pAVK (periphere arterielle Verschlusskrankheit), die Karotisstenose und das Bauchaortenaneurysma. Aus der Umfrage resultierte eine Prävalenz von einem der drei Erkrankungsbilder unter allen Teilnehmern von etwa 2% bei den 40- bis 50-Jährigen, 3,5% bei den 51- bis 60-Jährigen, 7,1% bei den 61- bis 70-Jährigen, 13% bei den 71- bis 80-Jährigen und 22,3% bei den 81- bis 90-Jährigen. <sup>9</sup>

Arteriosklerose entwickelt sich über Jahrzehnte und verläuft über einen langen Zeitraum symptomlos. Durch das langsame Voranschreiten der Erkrankung kommt es erst nach Jahren zu einer klinischen Manifestation, bedingt durch eine Minderperfusion im betroffenen Versorgungsgebiet. Das Auftreten, sowie der Grad der Ausprägung der Symptome hängt dabei von der Lokalität und der Größe der dafür verantwortlichen Plaques ab. Eine Ruptur oder ein Abriss dieser Plaques führt zur Ausbildung von Aneurysmen und durch den Transport der Plaques über die Blutbahn zu arteriellen Thrombosen in anderen Organen (Herzinfarkt, Niereninfarkt, Mesenterialinfarkt). Bei arteriosklerotischen Veränderungen an mittelgroßen und kleineren muskulären Gefäßen treten vor allem hämodynamisch relevante Einengungen der Gefäßlumina auf, die zu der entsprechenden Klinik der typischen Erkrankungsbilder bei den Patienten führen. <sup>10</sup>

Zu den häufigsten arteriosklerotisch bedingten Erkrankungen gehören die koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), das Bauchaortenaneurysma (BAA) und die Arteriosklerose der Halsschlagader (Karotisstenose) und der hirnversorgenden Arterien. <sup>4</sup>

Eine Lumeneinengung in den Herzkranzgefäßen führt zu einer koronaren Herzerkrankung, bei einem akuten Verschluss spricht man von einem Herzinfarkt. Leistungsminderung, Kurzatmigkeit, pectanginöse Beschwerden bis hin zu starken retrosternalen Schmerzen sind typische Krankheitszeichen. <sup>11</sup>

Unter dem Krankheitsbild periphere arterielle Verschlusskrankheit versteht man eine fortschreitende Stenosierung bis hin zu einer Okklusion der arteriellen Bein- und seltener auch der Armgefäße. Dies führt zu einer Minderperfusion unterhalb der Engstelle in der betroffenen Extremität und einhergehend mit Funktionsverlusten, Zelluntergang und starken Schmerzen. <sup>12</sup>

Die Karotisstenose beschreibt eine zunehmende Einengung der Arteria carotis communis oder einer ihrer Abgänge (Arteria carotis interna; Arteria carotis externa). Typische Symptome sind transitorische ischämische Attacken (TIA), Amaurosis fugax bis hin zu einem akuten Schlaganfall. <sup>13</sup>

Störungen der Gefäßwandintegrität äußern sich zumeist in der Ausbildung von Aneurysmen oder Dissektionen. Eine häufige Lokalisation für die Ausbildung von Aneurysmen ist die Aorta.

### 7.3 Pathogenese der Arteriosklerose

Die Krankheitsentstehung ist ein multifaktorieller Prozess. Zentraler Punkt ist die Ausbildung intimaler Läsionen, die man als Atherom oder atherotische Plaques bezeichnet. Diese sogenannten Atherome beeinflussen die Strömungsverhältnisse im Gefäßsystem. Sie führen zu Obstruktionen und durch Plaquerupturen zu arteriellen Thrombosen. Zudem wird durch eine Schwächung der anderen Gefäßwandschichten die Ausbildung von Aneurysmen und Dissektionen begünstigt. <sup>1</sup>

Die „Response-to-injury“-Hypothese des amerikanischen Arterioskleroseforschers Russel Ross aus dem Jahr 1976 ist bis heute ein allgemein akzeptiertes Modell der Atherogenese. Die Theorie basiert auf einem Zusammenspiel von endothelialer Dysfunktion und anhaltender Entzündungs- und Reparaturprozesse. <sup>15</sup>

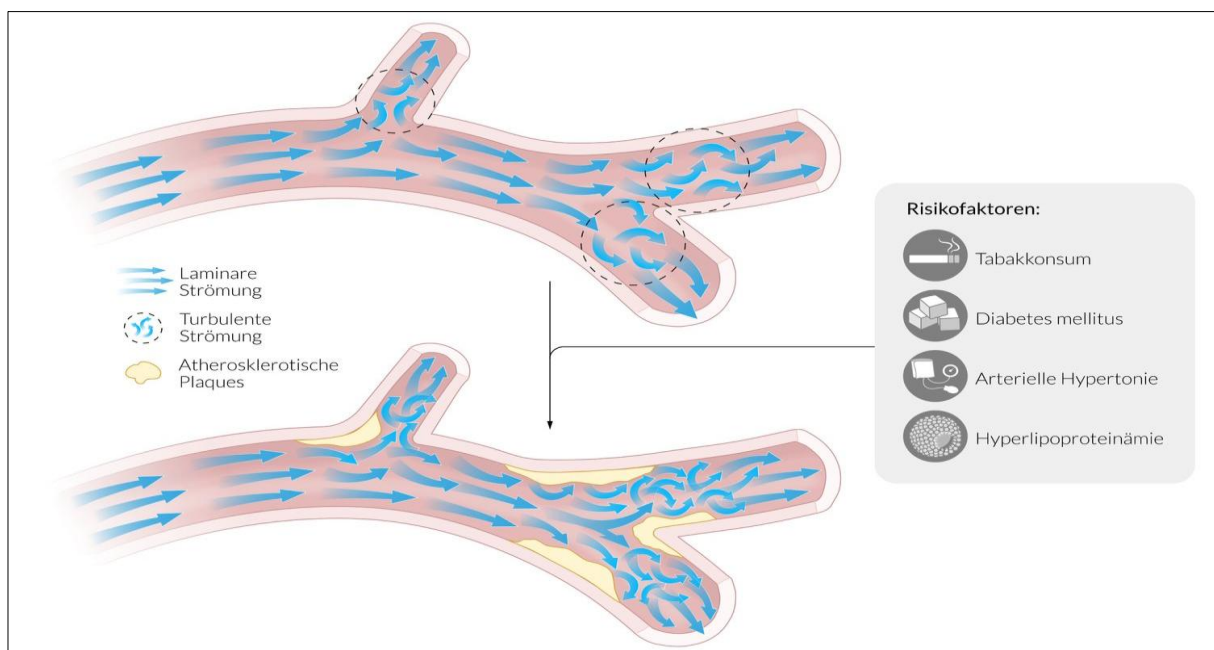
#### **Endotheliale Dysfunktion**

Ein wichtiger Faktor ist die Verminderung des laminaren Blutflusses. Die innerste Schicht der Blutgefäße ist mit Endothelzellen ausgekleidet. Ein gleichmäßiger Fluss (auch laminarer Blutfluss genannt) übt eine Kraft auf die Gefäße aus, die man als Schubspannung bezeichnet. Diese Kraft wird von den Endothelzellen wahrgenommen. Als Reaktion auf diese Schubspannung beginnen Endothelzellen Stickstoffmonoxid (NO) zu produzieren. <sup>16</sup>

Die lokale NO-Ausschüttung hat dabei gleich mehrere positive Effekte und wirkt unter physiologischen Bedingungen dem Prozess der Atherosklerose entgegen:

- Wachstumshemmung der Gefäßmuskulatur
- Lokale Weitstellung der Gefäße
- Hemmung der Anlagerung von Thrombozyten und Immunzellen an der Gefäßwand
- Hemmung der Oxidation von LDL in der Intima

Besonders gefährdet und deshalb auch häufig betroffen sind Gefäßabgänge und Bifurkationen. Hier kommt es bereits unter physiologischen Bedingungen zu turbulenten Strömungsverhältnissen (siehe Abbildung 1). Nach Ausbildung von atherosklerotischen Plaques in eben diesen Bereichen sind die endothelschädigenden Strömungsverhältnisse noch stärker ausgeprägt. Die lange andauernde und chronische Belastung führt zu einer endothelialen Dysfunktion. Klassische Risikofaktoren für den Funktionsverlust sind Hypercholesterinämie, Hypertonie, Rauchen und Diabetes mellitus. Es kommt zur Einleitung proinflammatorischer Signalwege durch die Endothelzellen. Dies geht einher mit erhöhter Permeabilität für Lipoproteine und anderen Plasmabestandteilen. Des Weiteren kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Chemokinen. Die NO-Produktion und -Ausschüttung ist zunehmend vermindert und der beschriebene lokale Schutz verfällt.<sup>16</sup>



**Abbildung 1** - Schematische Darstellung der physiologischen (oben) und pathologischen (unten) Strömungsverhältnisse sowie vier wichtige Risikofaktoren für die Ausbildung von Arteriosklerose.<sup>17</sup>

### **Ansammlung und Einwanderung von Lipoproteinen**

Durch eine Hyperlipidämie, allen voran eine Hypercholesterinämie, kommt es über die Zeit zur intimalen Akkumulation von Lipoproteinen. Durch freie Sauerstoffradikale und Makrophagen werden diese Lipoproteine zu sogenannten „Schaumzellen“ oxidiert. In der Arterienwand ist die Ansammlung von Schaumzellen makroskopisch als gelber Fleck erkennbar – man spricht auch von „fatty streaks“. <sup>15</sup>

### **Adhäsion von Thrombozyten und Monozyten am Endothel**

Bedingt durch die endotheliale Dysfunktion kommt es im Verlauf zur vermehrten Adhäsion von Thrombozyten und zu dessen Einwanderung in die Intima. Das löst eine Reaktion aus, bei der vermehrt Chemokine und Zytokine ausgeschüttet werden.

Zusätzlich adhären Monozyten am Endothel. Auch sie wandern in die innerste Gefäßschicht ein. Dort differenzieren sie sich zu Makrophagen, die wiederum durch Zytokinausschüttung eine fortführende Monozytenrekrutierung indizieren. <sup>18</sup>

### **Proliferation von glatten Muskelzellen**

Angetrieben durch die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wird die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen stimuliert. Diese stammen entweder direkt aus der Media, der mittleren Gefäßschicht, oder aber aus im Blut zirkulierenden Zellen. Sie sind zusammen mit sich anlagernden Matrixproteinen (Kollagene und Proteoglykane) maßgeblich an der Entstehung eines Atheroms beteiligt. <sup>18</sup>

Durch die entstandenen Schaumzellen wird die Ausschüttung von Zytokinen zusätzlich gefördert. Die Rekrutierung weiterer proinflammatorischer Zellen ist die Folge. Es kommt zur Aufrechterhaltung einer lokalen Entzündungsreaktion. <sup>1,15</sup>

Der hier beschriebene Kreislauf aus chronischer Inflammation mit dauerhafter Einwanderung von Immunzellen, der Schaumzellbildung und der Anlagerung von Kollagenen führt zur Ausbildung des Atheroms.

Das in seinem Kern befindliche nekrotische Material aus Cholesterin und totem Zellgewebe ist zunächst von einer fibrösen Kappe umgeben. Mit der Ruptur dieser Schutzhülle kommt es zur Ausschwemmung des nekrotischen Materials in das vaskuläre System. Die direkte Folge sind Gefäßverschlüsse im Rahmen von kardiovaskulären Ereignissen und daraus resultierender Ischämie.<sup>1</sup>

#### 7.4 Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)

Das Erkrankungsbild der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) beschreibt eine gestörte Durchblutung in den Extremitäten, entweder bedingt durch einen unvollständigen Verschluss (Stenose) oder einen vollständigen Verschluss (Okklusion) einer peripheren Arterie. Zumeist ist dabei die untere Extremität betroffen, nur selten treten symptomatische Veränderungen der oberen Extremität auf. In mehr als 95% der Fälle liegt die Ursache dabei in der Arteriosklerose. Andere Ursachen wie beispielweise Vaskulitiden, traumatische Gefäßverletzungen oder Durchblutungsstörungen im Rahmen eines Kompressionssyndroms sollten hier dennoch immer ausgeschlossen werden. Die Prävalenz der pAVK in der deutschen Allgemeinbevölkerung liegt bei etwa 5-10%. Bei Personen über 70 Jahren liegt die Prävalenz sogar zwischen 15-20%.<sup>12</sup>

Leitsymptom der pAVK ist der belastungsabhängige Ischämieschmerz distal einer vorliegenden Stenose. Man spricht auch von der Schaufensterkrankheit („Claudicatio intermittens“). Symptome wie blasse und kühle Extremitäten oder eine verzögerte Wundheilung können erste Anzeichen für eine pAVK sein. Dabei wird das Ausmaß der Symptomatik von der Lokalisierung der Engstelle, vom Stenosegrad und der Ausbildung von Kollateralkreisläufen beeinflusst.<sup>12, 19</sup>

Die Einteilung des Schweregrads der pAVK erfolgt klinisch anhand des Auftretens der Claudicatio-Beschwerden und auftretenden trophischen Störungen in Stadien nach Fontaine oder Rutherford.

Während im deutschsprachigen Raum vor allem die Verwendung der Fontaine-Stadien bevorzugt wird, ist die Rutherford-Klassifikation eher in englischsprachigen Ländern verbreitet.

19

---

<b>Stadium I</b>	Geringe Engstellen – Beschwerdefreiheit.
<b>Stadium IIa</b>	Belastungsschmerz; schmerzfreie Gehstrecke > 200 m
<b>Stadium IIb</b>	Belastungsschmerz; schmerzfrei Gehstrecke < 200m
<b>Stadium III</b>	Ischämischer Ruheschmerz
<b>Stadium IV</b>	Nekrosen/Gangrän/Ulcera

---

**Tabelle 1** – Stadieneinteilung der pAVK nach Fontaine.

## 7.5 Die koronare Herzerkrankung (KHK)

Die Manifestation der Arteriosklerose in den Koronararterien wird als koronare Herzerkrankung (KHK) bezeichnet und stellt bis heute mit einer Lebenszeitprävalenz von 9-10% bei den 40-79-Jährigen in Deutschland eine der größten Volkskrankheiten und die weltweit häufigste Todesursache dar.<sup>20</sup> Sie führt durch Verlust der Elastizität der Gefäße und progredienter Lumeneinengungen zu einer Minderperfusion des Myokards mit einer daraus resultierenden Sauerstoffunterversorgung des myokardialen Gewebes. Eine Einteilung erfolgt üblicherweise anhand der befallenen Stromgebiete: Ramus interventricularis anterior (RIVA), Rames circumflexus (RCX) und der Arteria coronaria dextra (RCA).

Je nach Anzahl der betroffenen Gefäße wird von einer Ein-Gefäß-Erkrankungen, einer Zwei-Gefäß-Erkrankungen oder einer Drei-Gefäß-Erkrankung gesprochen. Ist der Gefäßbereich vor der Aufteilung in RIVA und RCX betroffen, spricht man von einer Hauptstammstenose – einer Lumeneinengung der Arteria coronaria sinistra.<sup>21</sup>

Das Leitsymptom der KHK ist die Angina pectoris. Sie ist definiert als anfallsartig auftretender Schmerz und/oder Enge mit Druckgefühl – am häufigsten retrosternal lokalisiert. Ebenfalls häufig beschrieben sind Ausstrahlungen der Schmerzen in den linken Arm, in den Halsbereich, in den Rücken oder in den Oberbauch. Typischerweise treten die Symptome unter Belastung auf. Diese kann sowohl körperlich als auch psychisch sein. In der Regel sind die Beschwerden selbstlimitierend oder lassen nach Gabe eines Nitroglycerinpräparats nach. In diesem Fall spricht man von einer „stabilen Angina pectoris“. Ein Nicht-ansprechen auf die Medikamentengabe, persistierende Beschwerden über mehr als 20 Minuten oder auftretende Symptome aus körperlicher Ruhe werden als „instabile Angina pectoris“ bezeichnet. Die instabile Angina pectoris zählt bereits mit zum Krankheitsbild des akuten Koronarsyndroms. Eine Einteilung erfolgt dabei nach der „Canadian Cardiovascular Society“ (CCS).<sup>11, 19, 21</sup>

## 7.6 Die Karotisstenose

Arteriosklerotische Veränderungen in den extrakraniellen Anteilen der Arteria carotis die mit Lumeneinengungen des Gefäßes einhergehen bezeichnet man als Karotisstenose. Etwa 20% aller zerebralen Ischämien gehen auf Stenosen oder Verschlüsse der Halsschlagader zurück.<sup>22,23</sup> Die Prävalenz von arteriosklerotisch bedingten, extrakraniellen Karotisstenosen steigt vor allem ab dem 65. Lebensjahr deutlich an. Dabei ist das männliche Geschlecht nahezu doppelt so häufig betroffen.<sup>24</sup> Weitere Risikofaktoren sind Bluthochdruck, Diabetes mellitus und ein Nikotinabusus. Vor allem in Kombination der genannten Risikofaktoren kommt das Krankheitsbild zwei- bis dreimal so häufig vor.<sup>25</sup> Folge ist eine durch die Stenose bedingte Minderperfusion im nachfolgenden Stromgebiet. Bei einsetzender Symptomatik spricht man von einer symptomatischen Karotisstenose. Dabei handelt es sich entweder um einen Schlaganfall oder eine kurze, häufig reversible Attacke, auch TIA (transitorische ischämische Attacke) genannt. Typische Symptome sind eine retinale Ischämie („Amaurosis fugax“), einseitige motorische oder sensible Funktionseinschränkungen, sowie Sprach- und Sprechstörungen. Untypisch hingegen sind Schwindel, Doppelbilder, Gedächtnisstörungen und Kopfschmerzen.<sup>13</sup> Ein wichtiger Schritt im Rahmen der Diagnostik besteht in der Untersuchung des Blutflusses mittels einer Dopplersonografie oder einer farbkodierten Duplex-Ultraschalluntersuchung. Ergänzend kann eine Angiografie mittels CT oder MRT durchgeführt werden. An erster Stelle eines Therapiekonzepts steht die Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren, um ein Fortschreiten der Stenose zu verhindern.<sup>13</sup> Der Therapiestandard bei symptomatischen Patienten ist die Thrombendarteriektomie (TEA). Dabei werden die arteriosklerotischen Gefäßveränderungen ausgeschält und mit einem Kunststoffpatch vernäht. Beides trägt zur Gefäßerweiterung bei. Eine andere Therapieoption ist die perkutane Angioplastie (PTA). Dazu wird ein Ballonkatheter in das betroffene Gefäß eingebracht, um die Engstelle zu erweitern und mit Hilfe eines Stents offen zu halten.<sup>13</sup>

## 7.7 Bauchortenaneurysma

Als Bauchortenaneurysma wird eine pathologische Aussackung der abdominellen aortalen Gefäßwand bezeichnet. Von einem Aneurysma spricht man generell ab einer 1,5-fachen Vergrößerung des physiologischen Gefäßdurchmessers. Das entspricht einem Wert ab drei Zentimetern. Allerdings gilt es an diesem Punkt zu bedenken, dass der abdominelle Aortendurchmesser in Abhängigkeit von Alter, Körpergröße und Geschlecht variiert.<sup>14</sup> Männer sind häufiger betroffen als Frauen – dafür weisen Frauen ein deutlich erhöhtes Risiko für eine Ruptur auf. Etwa 3-4% der Bevölkerung >50 Jahre sind von einem abdominellen Aortenaneurysma betroffen. Die Prävalenz steigt mit zunehmendem Lebensalter.<sup>26,27</sup> Als klassische Risikofaktoren gelten dabei eine familiäre Disposition, Nikotinabusus und arterielle Hypertonie. Vor allem das Rauchen zählt hier zu einem wichtigen beeinflussbaren Risikofaktor in Bezug auf das Aneurysmawachstum und das Rupturrisiko.<sup>28</sup>

In den meisten Fällen ist ein Aortenaneurysma asymptomatisch und wird nicht selten als Zufallsbefund im Rahmen von Check-up-Untersuchungen in der hausärztlichen Versorgung entdeckt. Kommt es zur Ruptur, nimmt die Erkrankung nicht selten einen tödlichen Verlauf – über 60% der Patienten versterben noch vor Erreichen eines Krankenhauses.<sup>29</sup>

Klinische Anzeichen sind schwer zu benennen und sind stark von Lokalisation und Ausprägung der Gefäßveränderung abhängig. Typische Symptome können diffuse, unspezifische Bauch- oder Rückenschmerzen oder ein schlecht tastbarer, unterschiedlich starker Puls der Femoralarterien sein. In manchen Fällen lässt sich im Rahmen der körperlichen Untersuchung ein pulsierender Tumor als Anzeichen für die Aussackung im Bauchraum tasten.<sup>27</sup>

## 7.8 RNA

Im menschlichen Organismus sind alle genetischen Informationen in Form von Nucleinsäuren gespeichert. Man unterscheidet grundlegend zwei lineare Polymere: Die DNA (Desoxyribonucleinsäure, „deoxyribonucleic acid“) und die RNA (Ribonucleinsäure, „ribonucleic acid“). Sie bestehen aus vielen einzelnen Nucleotidbausteinen. Jeder Baustein besteht wieder aus einem Zucker – Desoxyribose bei der DNA und Ribose bei der RNA – einem Phosphatrest und einer von vier unterschiedlichen Basen: Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Bei der RNA steht an der Stelle von Thymin die Base Uracil. [31] Des Weiteren liegt die RNA im Gegensatz zur doppelsträngigen DNA in der Regel als einzelsträngiges Polynucleotid vor. Die Basen der RNA können zudem verschiedene Modifikationen aufweisen (z.B. anhängende Methylgruppen). Dadurch werden die Variationsmöglichkeiten der chemischen und physikalischen Eigenschaften der RNA-Moleküle um ein Vielfaches erhöht.<sup>30</sup>

Die RNA-Synthese, aus der sich im Zellkern befindlichen DNA erfolgt durch einen Prozess, den man Transkription nennt. Das dabei entstandene Endprodukt ist ein zum DNA-Strang komplementäres und in der Regel einzelsträngiges RNA-Molekül. Dieser RNA-Strang wird auch messenger-RNA (mRNA) genannt und bildet mit seiner spezifischen Basenreihenfolge die Vorlage für die Proteinbiosynthese, bei der aus verschiedenen Aminosäuren körpereigene Proteine aufgebaut werden. Dieser Prozess wird Translation genannt. RNA-Moleküle, die als Bauvorlage für körpereigene Proteinen dienen, nennt man deswegen auch codierende RNA. Diese unterscheidet man von den nicht-codierenden RNAs. Diese sind zwar an der Proteinbiosynthese beteiligt, dienen jedoch nicht als Bauvorlage für ein körpereigenes Protein. Je nach Struktur und Funktion können nicht-codierende RNAs in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Sie sind an der Genexpression als Informationsträger, Strukturkomponente, Adapter, Regulatoren und Katalysatoren beteiligt. Die häufigsten und wohl bekanntesten Subtypen der nicht-codierenden RNA sind zum einen die ribosomale RNA (rRNA) und zum anderen die transfer-RNA (tRNA). Die ribosomale RNA und die transfer-RNA stellen wichtige

Bestandteile für den Ablauf der Proteinbiosynthese dar. [31] Darüber hinaus gibt es noch weitere nicht-codierende RNA-Typen, die lediglich regulatorische Einflüsse auf die Proteinherstellung besitzen. Dazu gehört unter anderem die microRNA (miRNA).

## 7.9 Micro-RNA (miRNA)

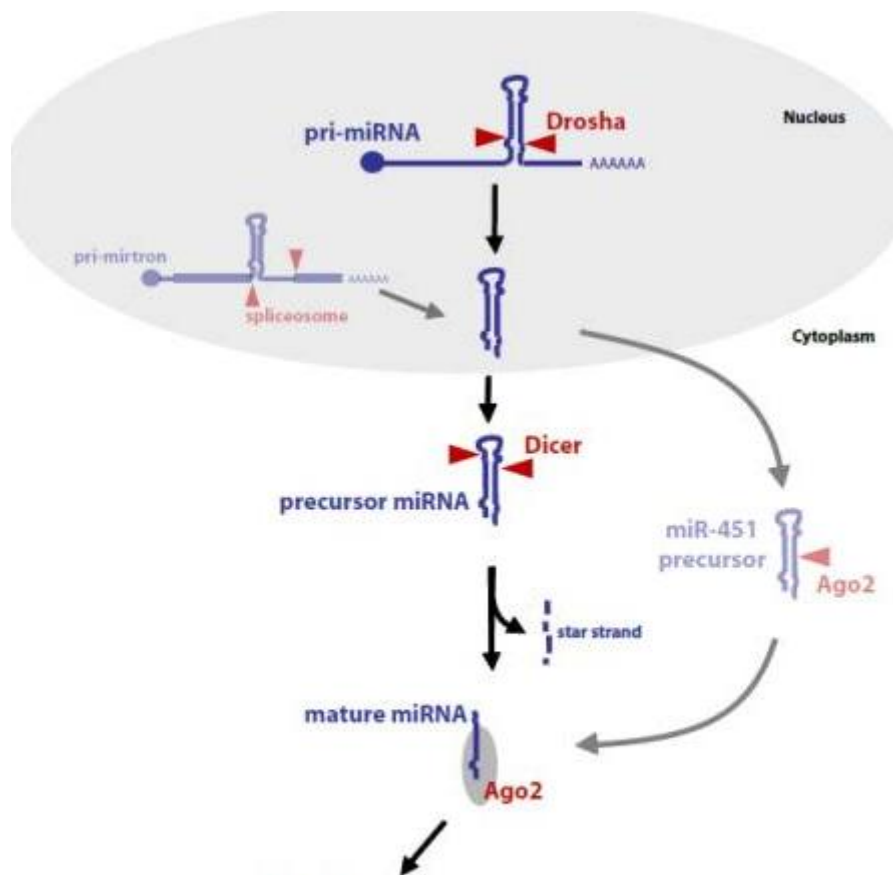
Die erste microRNA wurde vor mehr als 20 Jahren entdeckt. Damit wurde eine neue Ära in der Mikrobiologie eingeläutet. Bis heute sind mehr als 2000 miRNAs des Menschen entdeckt worden. Da sie seit der Entdeckung mit vielen Krankheiten in Verbindung gebracht werden konnten, sind sie ein interessantes Forschungsfeld in der klinischen Diagnostik und ein wichtiger Marker für Therapieansätze und Krankheitsverläufe.<sup>31</sup> Eine miRNA gehört zur Familie der nicht-codierenden RNA und besteht aus einer Kette von etwa 17-25 Nukleotiden. Sie modulieren auf zellulärer Ebene die Expression genetischer Informationen und nehmen damit nachweislich einen entscheidenden Einfluss auf Regulationsmechanismen für Prozesse der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und den Stoffwechsel.<sup>32,33</sup> Nach Bindung an der passenden Ziel-mRNA kommt es zur Hemmung der Proteinproduktion, indem die Stabilität der Ziel-mRNA beeinflusst oder aber der Translationsprozess herunterreguliert wird. Dabei kann eine einzige miRNA eine Vielzahl verschiedener Prozesse innerhalb der Zelle beeinflussen.<sup>33,34</sup> Die physiologischen Funktionen von miRNAs können in verschiedenen Zellen und Geweben völlig unterschiedlich sein.<sup>34</sup> Dabei findet man miRNAs sowohl im Zytosol innerhalb der Zelle, verpackt in extrazellulären Vesikel (ECV) oder in proteingebundener Form (z.B. an Lipidmoleküle) im Blutkreislauf.<sup>35</sup>

Die Herstellung der Oligonukleotide erfolgt aus einem Vorläufer, den man primäre miRNA nennt (pri-miRNA). Als Grundbaustein für die pri-miRNA dienen dabei miRNA-kodierend Gene. Diese werden auch als „nicht-codierende“-Gene bezeichnet, da deren einziges Produkt eine miRNA darstellt. Es gibt allerdings auch Ausnahmen, bei denen sich der miRNA-Code in einem Intron oder einem nicht-translatierbaren Bereich (untranslated region, UTR) eines kodierenden Gens befindet.<sup>31</sup> Die meisten miRNAs entstehen durch Transkription des miRNA-Gens durch die RNA-Polymerase II. Die entstandene pri-miRNA besitzt ein wichtiges Merkmal: eine Haarnadelstruktur. Durch das Enzym DROSHA wird die pri-miRNA noch im Zellkern in kleinere, kürzere Einzelstränge geschnitten. Diese neu gebildeten Oligonukleotide nennt man Vorläufer-

miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA), wobei die haarnadelartige Struktur erhalten bleibt. Ein Strang dieser doppelsträngigen pre-miRNA bildet dabei der Grundlage für die reife miRNA. Über das spezielle Transportprotein Exportin-5 wird GTP-abhängig die pre-miRNA aus dem Zellkern ausgeschleust.<sup>34,36</sup> Im Zellplasma erfolgen nun die letzten Schritte zur Herstellung der miRNA. Die Haarnadelstruktur der pre-miRNA wird durch das Enzym DICER in zwei Einzelstränge gespalten. Diese sind in der Regel zwischen 17-25 Nukleotide lang und können je nach miRNA in ihrer Länge variieren. Die beiden entstandenen Stränge werden durch den RNA-Induced-Silencing-Complex (RISC) gebunden. Der eine Strang bildet die reife miRNA (mature miRNA). Der zweite Strang wird durch den RISC abgebaut. Für den Abbau des zweiten, sogenannten „Star“-Stranges ist die enzymatische Aktivität des Argonautproteins 2 (AGO 2) verantwortlich. Das AGO 2 ist einer der wenigen Bestandteile des RISC-Proteinkomplexes, der bis heute bekannt ist. Gleichzeitig wird durch das AGO 2 die reife miRNA gebunden. Erst nach Bindung der reifen miRNA beginnt es mit der Suche nach einer passenden Ziel-mRNA.<sup>31</sup>

Es gibt allerdings miRNAs im menschlichen Organismus die einen anderen Prozessierungsweg haben. Diese miRNAs werden deswegen auch als miRNAs der Mirtron-Klasse bezeichnet. Es handelt sich dabei um miRNAs, deren Gene für die Kodierung an Übergängen zwischen Introns und Exons zu finden sind. Damit umgehen sie den Produktionsschritt durch das Enzym DROSHA. Sie werden durch verschiedenen Spleißosomen noch im Zellkern herausgeschnitten. Die nachfolgenden Bearbeitungsschritte durch die Proteinkomplexe RISC & DICER bleiben gleich.

Die Bindung einer reifen miRNA erfolgt über das als „Seed“- oder „Core“-Region bezeichnete 5'Ende. Diese muss dabei komplementär zur Ziel-mRNA sein, da nur so ein perfektes Andocken des RISC-miRNA-Komplexes möglich ist. Das Gegenstück der Seed- bzw. Core-Region auf der miRNA wird als „miRNA Recognition Element“ (MRE) bezeichnet.



**Abbildung 2** – Dargestellt ist hier der Prozessweg bei der Herstellung einer miRNA. Aus der durch Transkription entstandenen pri-miRNA wird durch das Enzym DROSHA eine haarnadelartige Struktur herausgeschnitten. Es entsteht die Vorläufer-miRNA. Nach dem Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma erfolgte die Aufteilung der Vorläufer-miRNA in zwei Einzelstränge durch das Enzym DICER. Beide Stränge werden durch den RISC gebunden, wobei ein Strang als reife miRNA fungiert und der zweite Strang abgebaut wird.<sup>31</sup>

Es befindet sich in den allermeisten Fällen in dem untranslatierten Bereich am 3'Ende der Ziel-mRNA. Nur im Falle einer vollständigen Übereinstimmung zwischen der Seed- und der MRE-Region erfolgt eine Reaktion an der Ziel-mRNA.<sup>33</sup> Sollte keine Übereinstimmung vorliegen, werden verschiedene Prozesse in Gang gesetzt: Durch die Rekrutierung des Proteins GW 182 durch Ago2 wird die Translation unterdrückt. Alternativ kommt es durch eine Interaktion des RISC mit dem Enzym Deadenylase CCR4-NOT zur Entfernung des Poly-A-Schwanzes der Ziel-mRNA, wodurch es folglich zum Abbau eben dieser Ziel-mRNA kommt.<sup>31,33</sup>

Eine vollständige Übereinstimmung zwischen den Nukleotiden der reifen miRNA und der Ziel-RNA liegt nahezu nie vor. Das hat zur Folge, dass eine einzige miRNA mit vielen verschiedenen mRNAs interagieren kann.<sup>37</sup>

## 7.10 miRNAs und Arteriosklerose – ein aktueller Stand

MiRNAs sind schon seit einigen Jahren in den Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt. Die Analyse von miRNA-Funktionen ermöglicht einen vielversprechenden Einblick in ihre komplexen Regulationsvorgänge. So konnten im letzten Jahrzehnt zahlreiche Daten vorgelegt werden, die belegen, dass Spiegelveränderungen der miRNA-Expressionen, beispielweise durch Fehlregulierungen, stark mit dem Vorkommen bzw. dem Ausbleiben von arteriosklerotisch bedingten Erkrankungen verbunden sind.<sup>38,39</sup>

Böttger und Kollegen ist es gelungen, für die miR-143 und die miR-145 eine Spezifität für glatte Muskelzellen in Blutgefäßen nachzuweisen. Eine Deletion der beiden miRNAs führte zu einer verminderten Kontraktilität der Gefäße und vermehrten arteriosklerotischen Veränderungen in den Blutgefäßen.<sup>40</sup>

Durch ein abweichendes Proliferationsverhalten von miRNAs wie beispielweise die miR-22 kommt es zu Störungen in der Differenzierung von glatten Muskelzellen. Das kann einen kontraktilen Funktionsverlust zur Folge haben, was wiederum den Prozess der Arteriosklerose fördert.<sup>41,42</sup>

Für andere miRNAs konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie einen indirekten oder auch direkten Einfluss auf den Prozess der Atherogenese haben. Der Arbeitsgruppe um Libby und Kollegen gelang 2012 der Nachweis, dass durch miRNAs entzündliche Prozesse am Endothel induziert werden können und somit an der Atherogenese direkt beteiligt sind.<sup>43</sup>

Einige Studien weisen darauf hin, dass einzelne miRNAs in der Lage sind mehrere biologische Prozesse zu regulieren, die wiederum für das Fortschreiten der Arteriosklerose verantwortlich sind. So ist es Fan und Kollegen gelungen, die miRNA-21 mit der Infiltration von Makrophagen in die Intima und der damit hervorgerufenen Entzündungsreaktion und Proliferation von glatten Muskelzellen in Verbindung zu bringen.<sup>44</sup>

Diese wenigen Beispiele legen nahe, dass ein erhöhtes oder aber auch vermindertes Expressionsniveau von miRNAs einen krankheitsfördernden Effekt bei der Entstehung der Arteriosklerose einnehmen können. Das macht miRNAs bei arteriosklerotischen Erkrankungen im Rahmen der Krankheitsidentifizierung und der weiteren Überwachung als potenziellen Biomarker zu einem interessanten Forschungsfeld mit großem Potential.

### 7.11 Ziel der Arbeit

Begründet durch den zunehmend progredienten Verlauf und der erst späten Manifestation bei arteriosklerotischen Krankheitsbildern sollen in dieser klinischen Studie verschiedene anamnestische Gesichtspunkte sowie Populationsmerkmale der Patienten katalogisiert und bei vier unterschiedlichen arteriosklerotischen Krankheitsbildern mit Bezug auf die miRNA-Expression untersucht werden.

Dabei wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- 1) Lassen sich Veränderungen bei den miRNA-Expression erkennen bei einem Vergleich zwischen den Patienten mit einer arteriosklerotischen Erkrankung und vergleichbare gesunde Probanden?
- 2) Lassen sich krankheitsspezifische Muster bei der miRNA-Expression erkennen?
- 3) Gibt es einen erkennbaren Zusammenhang zwischen der Exprimierung von arteriosklerose-spezifischen miRNAs mit allgemeinen erhobenen Populationsmerkmalen und mit dem arteriosklerotischen Risikoprofil der Patienten?

## 8. Material und Methoden

### 8.1 Studiendesign

In dieser prospektiv, explorativ angelegten Studie wurden insgesamt 277 Patienten eingeschlossen. Weitere 186 gesunde Probanden wurden als Kontrollgruppe untersucht. Nach entsprechender Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patienten zur Teilnahme an der Studie, wurden die patientenbezogenen und studienrelevanten Daten pseudonymisiert. Dafür erhielt jeder Patient einen zufällig generierten achtstelligen alphanumerischen Code. Diesem Code wurden im Anschluss alle relevanten Patienteninformationen zugeordnet und in einer extra für Studienzwecke angelegten elektronischen Datenbank katalogisiert und gespeichert. Dieses System ermöglicht im weiteren Studienverlauf eine Analyse und Auswertung der patientenspezifischen Informationen. Mit der elektronischen Datenbank wurden bis zu 113 Variablen pro Patient dokumentiert. Auch die entnommenen Blutproben wurden nach sachgemäßer Verarbeitung durch ein Probenverwaltungssystem dokumentiert und katalogisiert. Für die Blutproben wird die Anzahl der Proben, der Lageort und die Lagebedingungen in den Gefrierschränken überwacht. Alle zuordnungsfähigen Daten waren dabei ausschließlich dem an der Studie teilnehmenden Personal zugänglich.

### 8.2 Ethikvotum

Geprüft wurde das beschriebene Vorgehen durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München und abschließend als ethisch unbedenklich eingestuft (Projekt-Nr.: 17-572).

### 8.3 Patientenauswahl & Patientenidentifikation

Die Patienten wurden anhand im Vorfeld definierter Ein- bzw. Ausschlusskriterien (s. Tabelle) ausgesucht. Dabei wurde die arteriosklerotische Patientengruppe in vier weitere Untergruppen unterteilt: Patienten mit einem abdominalen Bauchaortenaneurysma (BAA), Patienten mit einer Karotisstenose (KS), Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) und Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK). Im Rahmen der Aufnahme erfolgte eine gründliche Untersuchung der Patienten, eine strukturierte Anamnese sowie eine genaue Betrachtung ihrer Krankheitsverläufe.

Die Patientenrekrutierung erfolgte dabei an zwei unterschiedlichen Standorten in München. Zum einen im Klinikum der Universität München Großhadern (Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie – Abteilung für Gefäßchirurgie) und zum anderen im Klinikum Neuperlach (Klinik für Gefäßchirurgie – Zentrum für vaskuläre und endovaskuläre Chirurgie). Alle Studienteilnehmer wurden im Vorfeld durch einen ärztlichen Mitarbeiter ausführlich über den Grund für die Teilnahme an der Studie und die erforderliche Blutentnahme aufgeklärt. Die Einwilligung der Patienten wurde dabei schriftlich dokumentiert.

In die Studie eingeschlossen wurden folgende Patienten:

- Schriftliche Einwilligung der Patienten
- Alter > 18 Jahre
- Periphere arteriell Verschlusskrankheit – unabhängig vom Stadium
- Karotisstenose – unabhängig vom Stadium
- Bauchaortenaneurysma – unabhängig der Lokalisation
- Koronare Herzerkrankung – unabhängig von der Ausprägung

Nachfolgende Kriterien führten zu einem Studienausschluss:

- Fehlende Einwilligung durch den Patienten
- Alter < 18 Jahren
- Schwangerschaft/Stillzeit
- Infektiöse Erkrankungen (z.B. Endokarditis, HIV, Hepatitis)
- Maligne Erkrankungen
- Limitierte Lebenserwartungen: weniger als sechs Monate
- Bestehende Immunsuppression oder laufende Kortisontherapie (z.B. nach Transplantationen)
- Akute Erkrankungen/Notfälle, die einer sofortigen Intervention bedürfen

Die Rekrutierung der erforderlichen Kontrollgruppe erfolgte anhand des Charlson Comorbidity Index (CCI). Der CCI ist ein Scoring-System, in dem das Vorhandensein von unterschiedlichen Erkrankungen definiert wird, die einen relevanten Einfluss auf die Zehn-Jahres-Mortalität haben. In diesen Score fließen 19 verschiedene Grunderkrankungen ein. Diese werden je nach Erkrankungsart unterschiedlich gewichtet. <sup>45</sup>

## 8.4 Probenentnahme & Probenweiterverarbeitung

### 8.4.1 Präinterventionelle Blutentnahme

Die venöse Blutentnahme erfolgte, gemäß den vor Studienbeginn festgelegten Richtlinien, im Vorfeld einer geplanten Intervention. Dabei wurden zwei 9ml-Serumröhrchen (S-Monovette, Sarstedt, Deutschland), zwei 4,9ml-EDTA-Röhrchen (S-Monovette, Sarstedt, Deutschland) und ein 2,7ml Li-Heparin-Röhrchen (S-Monovette, Sarstedt, Deutschland) entnommen. Für die Isolation der RNAs wurde ein spezielles Blutröhrchen verwendet: das PAXgene® Blood RNA System (BD, Heidelberg). Das System beinhaltet ein Blutröhrchen sowie ein separates Kit für die Isolation der RNA.

Dieses PAXGene Röhrchen enthält zusätzliche Stabilisatoren, die einen verfrühten Abbau der Zellen nach der Blutentnahme verhindern. Eine Degradation der zellulären RNA und ein verfälschtes Genexpressionsmuster können dadurch deutlich verringert werden.

### 8.4.2 Verarbeitung der Blutproben

Die gewonnenen Blutproben der Patienten wurden innerhalb von 30 Minuten nach der venösen Punktion abzentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte für zehn Minuten bei 2000G. Mittels einer 1000µl-Pipette wurde der abzentrifugierte Überstand abpipettiert und in vorbeschriftete Röhrchen (1ml Microtubes) umgefüllt. Dabei wurden sechs Microtubes mit Serum aus Serumröhrchen befüllt, und jeweils drei Microtubes aus einem der beiden EDTA-Röhrchen und aus dem Li-Heparin-Röhrchen. Das zweite EDTA-Röhrchen wurde nicht zentrifugiert und mit den Microtubes zusammen bis zur Weiterverarbeitung in beschrifteten Kartons bei -80°C eingefroren. Durch die Beschriftung konnte eine exakte Zuordnung der Blutproben zu jeder Zeit gewährleistet werden. Das PAXgene® Blood RNA System (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde gemäß den Herstellerangaben zunächst bei 18°C Raumtemperatur für 24 Stunden inkubiert und anschließend ohne Zentrifugation ebenfalls bei -80°C eingefroren und zwischengelagert.

## 8.5 Extraktion der zu untersuchenden Blutbestandteile

### 8.5.1 Extraktion der Exosomen

Die Exosomen aus den Serumproben der Patienten wurden mittels dem „Quiagen miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit“ (Venlo, Niederlande) und gemäß des Herstellerprotokolls (Exiqon A / S) isoliert. Die Methode basiert auf der Ausbildung eines Polymernetzes unter vorgeschriebenen, physikalischen und biochemischen Voraussetzungen (Temperatur, angepasster Salzgehalt).

Durch das Polymernetz wird die Löslichkeit herabgesetzt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 4°C erfolgte die Isolation der Exosomen durch anschließende Zentrifugation und abschließender Resuspension.

Dazu wurden die Proben unter Zugabe von 10µl Thrombin in 15ml Eppendorfgläser umgefüllt. Durch die Thrombinzugabe können verbliebene Gerinnungsfaktoren entfernt werden. Das Gemisch wurde nach Durchmischung mittels eines Vortex für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, ehe die Lösung bei 10000G zentrifugiert wurde. Der abzentrifugierte Überstand wurde anschließend in neue Eppendorfgläser überführt. In einem nächsten Arbeitsschritt wurde 400µl Präzipitationspuffer A gemäß den Herstellerangaben hinzugefügt. Alles wurde weitere fünf Sekunden mit Hilfe eines Vortex vermischt. Die entstandene Lösung wurde anschließend für 60 Minuten bei 2-8°C inkubiert, bevor eine weitere Zentrifugation bei 1500G für 30 Minuten durchgeführt wurde. Der durch die Zentrifugation entstandene Überstand wurde erneut verworfen. Es erfolgte die Zugabe von 270µl Resuspensionspuffer aufs Pellet. Im Anschluss musste mittels einer Pipettenspitze das Pellet mechanisch gelöst werden. Als letzten Arbeitsschritt galt es nun alles nochmals mit dem Vortexer zu mischen, bis das Pellet vollständig resuspendiert war. Abschließend wurde alles im Kühlschrank bis zur letztendlichen Analyse zwischengelagert.

### 8.5.2 Qualitätskontrolle der extrahierten Proteine

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und einem Western Blot konnten Quantität und Qualität der isolierten Exosomen bestätigt werden. Die TEM ermöglicht die Abbildung von Objekten, in unserem Fall von Proteinen, mit Hilfe von Elektronenstrahlen mit einer Auflösung bis zu 0.045nm. Bei biologischen Materialien liegt die Beschleunigungsspannung dabei im Bereich von 80-120kV. Für die TEM wurden die isolierten Exosomen in einer Phosphat-gepufferten-Salzlösung (PBS) verdünnt und im Anschluss auf mit Formvar beschichteten Kupfergittern (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) aufgetragen. Es folgte eine 30-sekündige Negativfärbung mit 2%-Uranylacetat (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland) und eine abschließenden Lufttrocknung. Mit dem Elektronenmikroskop Zeiss EM900 mit 80kV (Carl Zeiss Mikroskop GmbH, Jena, Deutschland) und mit einer „Wide-angle-dual-speed“-2K-CCD Kamera konnten nun die isolierten Exosomen auf Qualität und Quantität untersucht werden.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde zusätzlich ein Western Blot durchgeführt. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine auf einen Träger mit Polyacrylamid-Gel gegeben und mit Hilfe einer angelegten Spannung (Elektrophorese) entsprechend ihrer Größe und ihrer elektrischen Ladung aufgetrennt. Es entstehen unterschiedliche Proteinbanden. Im Anschluss erfolgt das „Blotting“. Der Begriff beschreibt das Übertragen der Proteinbanden auf einen festen Träger mittels senkrecht zur Laufrichtung des Polyacrylamid-Gels angelegter Spannung. Das ermöglicht die Wanderung der Proteinbanden aus dem Gel heraus auf eine feste Membran, wobei die Anordnung der getrennten Proteine erhalten bleibt. Nun ist es möglich, bestimmte Proteine mit spezifischen Antikörpern zu identifizieren. Dieser Vorgang nennt sich „Immundetektion“. Die primären Antikörper zur Identifizierung waren von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) (goat anti-CD63, sc-31214; 1:1000), Antibodies-online.com (Atlanta, USA) (goat-anti-CD63, ABIN1440014, 1:1000) und OriGene Technologies (OriGene Technologies, Rockville, USA) (rabbit anti-CD81, TA343281 and rabbit anti-TSG101, TA343598). Die sekundären Antikörper wurden von Santa Cruz Biotechnology

(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) (donkey anti-goat IgG-HRP, sc-2033, 1:5000 and goat anti-rabbit IgG-HRP, sc-2030, 1:5000) bezogen.

### 8.5.3 Extraktion der RNA aus den Serumproben

Die Isolation der RNA aus den Serumproben erfolgte mittels NucleoSpin miRNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) gemäß den Herstellerangaben. Dazu wurde die isolierten RNA in 30µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Im Anschluss wurde eine Qualitätskontrolle der isolierten RNA mit dem „RNA 6000 Nano Assay“ auf dem „Bioanalyzer 2100“ (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA) durchgeführt. Die Bioanalyzer RNA-Kits ermöglichen eine präzise Integritätsprüfung und eine zuverlässige Probenquantifizierung.

### 8.5.4 Extraktion der RNA aus den Blutzellen

Zur Extraktion der Blutzellen-RNA wurden die Blutröhrchen des PAXgene® Blood RNA Systems aufgetaut und anschließend mit dem PAXgene-Blut-miRNA-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß dem Herstellerprotokoll weiterverarbeitet. Der erste Arbeitsschritt besteht aus der Isolation der Nukleinsäuren durch eine Zentrifugation. Nach anschließender Resuspension. Eine Pufferlösung wird hinzugegeben. Zusätzlich erfolgt die Zugabe von Proteinase K zur Inkubation der Lösung aus Puffer und Nukleinsäuren. Mittels einer weiteren Zentrifugation werden verbliebene Zellreste entfernt und das Gemisch homogenisiert. Der Überstand wird nun in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zugabe von Ethanol gemäß den Herstellerangaben wird das Lysat auf eine PaxGene RNA Spin Column (PRC) gegeben. Dabei handelt es sich um ein Röhrchen mit einer Silikamembran, an welcher RNA-Moleküle selektiv binden können. Um letzte DNA-Bestandteile zu entfernen, wird die Lösung zusätzliche mit DNase I behandelt. Nun erfolgen mehrere Waschschrirte. Zum Abschluss wird die übriggebliebene RNA in einen Elutionspuffer gegeben und durch Erhitzung denaturiert.

Auch hier erfolgte eine anschließende Qualitätskontrolle der miRNA-Ausbeute. Diese wurde gemäß Herstellerangaben durch das Fluoreszenz-Messgerät Qubit 2.0 und dem „RNA HS Assay Kit“ (Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland) quantifiziert.

### 8.5.5 Hochdurchsatz-Sequenzierung

Mittles „NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set“ von Illumina (New England BioLabs Inc., USA) wurde die extrahierte RNA an beiden Enden ihrer Sequenzen mit passenden Adaptoren verknüpft. So konnten diese Strangabschnitte in einen komplementären DNA-Abschnitt (cDNA) umgeschrieben werden. Diese cDNA-Abschnitte wurden im Anschluss durch eine Polymerase-Kettenreaktion in einem ersten Schritt vervielfältigt und danach mit einem Barcode versehen werden. Es erfolgte der Länge nach eine Auftrennung der zahlreichen cDNA-Stränge per Gelelektrophorese. Dieser Prozess wurde mit Hilfe des „MinElute Gel Extraktion Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. So konnten die 130-150 basenpaar-langen cDNA-Abschnitte herausgefiltert werden. Anschließend erfolgte wiederum eine Qualitätskontrolle der besagten Abschnitte mittels dem „High Sensitivity DNA-Kit“ (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und dem Bioanalyzer (Agilent).

Für die im Rahmen dieser Studie eingesetzten kommerziellen Extraktions- und Isolationskits liegen seitens der Hersteller keine detaillierten Angaben zur analytischen Varianz bei wiederholter Analyse identischer Probenaliquots vor. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde daher primär durch standardisierte Protokolle, identische Prozessierungsbedingungen und die nachgeschaltete bioinformatische Qualitätskontrolle sichergestellt. Die anschließende Sequenzierung wurde mittels single-end-Methode in 50 Zyklen auf der HiSeq2500 (Illumina Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

Die Sequenzierung und Analyse der Blutproben bzgl. der microRNA-Expressionsprofile wurde durch unseren Kooperationspartner des Wissenschaftszentrums Weihenstephan der technischen Universität München durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

## 8.6 Datenanalyse und Datenauswertung

### 8.6.1 Bioinformatische Analyse

Zur Identifikation der Zielgene der detektierten miRNAs und deren Beteiligung an wichtigen Signalkaskaden wurde die Ingenuity Pathway Analysis (IPA®) (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Software, die über das Internet auf eine Literaturdatenbank mit mehr als fünf Millionen wissenschaftliche Artikel zurückgreift und kontinuierlich aktualisiert wird.

Zur Qualitätskontrolle des Sequenzierungsdatensatzes wurde das Programm FastQC (Version 0.11.9) verwendet. Adaptersequenzen von Lesevorgängen wurden mit btrim32 (Version 0.3.0) getrimmt. Reads ohne Adapter wurden ebenso entfernt wie Reads mit weniger als 16 Nukleotiden Länge. Das Alignment der Reads wurde mit Bowtie (Version 1.2.3) durchgeführt. Der Cut-off für Reads wurde auf maximal eine Nichtübereinstimmung gesetzt. MiRNA-Referenzen wurden von miRBase (Release 22.1) bezogen. Identifizierte Sequenzen von rRNAs und tRNAs wurden erkannt und aus dem Datensatz entfernt. Abschließend wurden miRNAs sowie snoRNAs und snRNAs identifiziert und gezählt. Die miRNA-Analysepipeline wurde in verschiedenen Biomarker-Studien häufig und erfolgreich eingesetzt.<sup>46</sup>

### 8.6.2 Analyse der Genexpression

Für die Differenzierung der unterschiedlichen miRNA-Expressionsmuster wurde eine DGE-Analyse mit dem Programm R (Version 4.0.3; R Core Team, 2020) und dem Zusatzpaket DESeq2 (Version 1.28; Love & Huber & Anders; 2014) durchgeführt. Mittels der eingeschlossenen Normalisierungsmethode wird die Vergleichbarkeit der Proben zwischen den Sequenzierungsläufen ermöglicht (mediane Verhältnisse des Mittelwerts). Durch die lineare Modellierung des DESeq2-Algorithmus wurde ein möglich entstehender Batch-Effekt berücksichtigt und ausgeglichen. Für die Korrektur für die statistische Analyse der Gruppenvergleiche wurde die Benjamin-Hochberg-Methode angewendet. Es wurden zwei

Ergebnissätze erarbeitet: einen Standardsatz durch eine Filterung nach  $p\text{-Wert} \leq 0.1$  und ein zweiter, strengerer Satz durch zusätzliche Filterung ( $\log_2FC \geq |1|$  und Basismittelwert  $\geq 50$ ). Für die Überlappungsanalyse wurden sowohl der Standardsatz als auch die Ergebnisse der zweiten Filterung der DGE-Analysen verwendet. Die Analyse erfolgte mit R (Version 4.0.3; R Core Team, 2020) und dem Zusatzpaket `vecompare` (Version 0.1.0; Levernier & Wacha, 2017).

### 8.6.3 Statistische Auswertung der Patientendaten

Die demographische und statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von Excel (Microsoft, Version 2312). Die ausgewerteten statistischen Daten sind als Mittelwerte dargestellt ( $\pm$  des mittleren Standardfehlers). Mittels Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die Daten auf Normalverteilung untersucht. Beim Vorliegen von normalverteilten Daten kamen der Students t-Test für den Vergleich zweier Stichproben bzw. der one-way ANOVA-Test bei Gruppenvergleichen zum Einsatz. Bei nicht vorliegender Normalverteilung wurden die statistischen Rechnungen mittels Man-Whitney-U-Test beim Vergleich von zwei Stichproben und mit dem Kruskal-Wallis-Test für Gruppenvergleiche durchgeführt. Ein durchgeführter Test galt dabei dann als signifikant, wenn sich der p-Wert kleiner als die Irrtumswahrscheinlichkeit Alpha (5%) zeigte.

## 9. Ergebnisse

### 9.1 Demographie der Gesamtpopulation

Für diese Studie ist die Patientenrekrutierung an zwei verschiedenen Standpunkten erfolgt: Zum einen am Klinikum der Universität München, Großhadern (Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie und der Klinik für Gefäßchirurgie) und zum anderen im Klinikum Neuperlach (Klinik für Gefäßchirurgie – Zentrum für vaskuläre und endovaskuläre Chirurgie).

Insgesamt konnten 166 Patienten in die Studie eingeschlossen werden – 134 Patienten mit einer arteriosklerotischen Erkrankung. Dabei wurden vier Erkrankungsgruppen unterschieden: Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit (KHK: n = 35), Patienten mit einem abdominellen Bauchaortenaneurysma (BAA: n = 35), Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK: n = 36) und Patienten mit einer Karotisstenose (KS: n = 28). Die Kontrollgruppe zählt n = 32 Patienten. Einige der Patienten hatten zum Aufnahmezeitpunkt mehr als eine bekannte arteriosklerotische Läsion. Die Gruppeneinteilung der Studienteilnehmer erfolgte dabei immer begründet durch den aktuellen Klinikaufenthalt. Daher wurde für alle Patienten eine ausführliche Anamnese erhoben und auch sekundäre arteriosklerotische Erkrankungen miterfasst. Die Informationen zur Demographie der Studienpopulation sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

<b>Patientengruppe</b>	<b>BAA</b>	<b>KHK</b>	<b>pAVK</b>	<b>KS</b>
Patientenzahl	35	35	36	28
Alter (Min./Max.)	71 (39/87)	69 (53/82)	70 (50/95)	74 (60/93)
BMI (25./75. Quartil)	24.7 (22.3 – 26.0)	29.5 (25.9 – 30.9)	29.5 (25.9 – 31.2)	27.7 (24.9 – 30.2)
Männer/Frauen	27 / 8	25 / 10	27 / 9	21 / 7
<b><i>Risikofaktoren</i></b>				
Hypertension (Ja/Nein/Unbek.)	26 / 6 / 3	27 / 7 / 1	26 / 8 / 2	21 / 3 / 4
Diabetes (Ja/Nein/Unbek.)	6 / 26 / 3	11 / 23 / 1	21 / 14 / 1	15 / 8 / 5
Rauchen (Ja/Nein/Unbek.)	15 / 17 / 3	12 / 21 / 2	21 / 9 / 6	10 / 17 / 1
<b><i>Dauermedikation</i></b>				
ASS (Ja/Nein)	22 / 13	28 / 7	27 / 9	15 / 13
ACE-Hemmer (Ja/Nein)	17 / 18	20 / 15	19 / 17	14 / 14
Antikoagulation (Ja/Nein)	8 / 27	5 / 30	8 / 28	1 / 27
Betablocker (Ja/Nein)	17 / 18	20 / 15	18 / 18	11 / 17
Orale Antidiabetika (Ja/Nein)	3 / 32	8 / 27	16 / 20	12 / 16
Insulin (Ja/Nein)	0 / 35	4 / 31	4 / 32	1 / 27
Statine (Ja/Nein)	21 / 14	25 / 10	28 / 8	6 / 22
Antidepressiva (Ja/Nein)	2 / 33	2 / 33	6 / 30	18 / 10

**Tabelle 2** – Übersicht zu demographischen Daten aller Patienten mit einer arteriosklerotischen Erkrankung.

Patientengruppe	BAA	KHK	pAVK	KS
<b>Aneurysma</b>				
Durchmesser in mm (25. & 75. Quartil)	52.0 (45.2 – 60.0)	-	-	-
Symptomatisch (Ja/Nein/Unbekannt)	6 / 23 / 6	0 / 29 / 5	0 / 31 / 5	0 / 20 / 8
Dissektion (Ja/Nein/Unbekannt)	3 / 28 / 4	0 / 29 / 5	0 / 31 / 5	0 / 20 / 8
<b>KHK</b>				
EF (%) (25. und 75. Quartil)	56.5 (54.5 – 63.2)	56.5 (50.0 – 67.5)	34.0 (32.0 – 36.0)	-
NYHA-Stadium (I / II / III / IV / Kein NYHA / Unbekannt)	2 / 1 / 4 / 1 / 20 / 7	3 / 7 / 10 / 8 / 5 / 2	0 / 0 / 2 / 1 / 24 / 9	1 / 0 / 0 / 0 / 18 / 5
Vorhofflimmern (Ja/Nein/Unbekannt)	2 / 26 / 7	7 / 28 / 0	4 / 26 / 6	1 / 22 / 5
<b>pAVK</b>				
Stadien nach Fontaine (Keine pAVK / I / IIa&IIb / III / IV / Unbekannt)	26 / 1 / 1 / 1 / 0 / 0 / 7	27 / 0 / 1 / 1 / 0 / 0 / 6	0 / 0 / 16 / 2 / 17 / 1	20 / 0 / 1 / 1 / 0 / 4 / 3
<b>Karotisstenose (KS)</b>				
Karotisstenose (Ja/Nein/Unbekannt)	0 / 29 / 6	10 / 21 / 4	4 / 29 / 3	25 / 1 / 2
Symptomatisch (Ja/Nein/Unbekannt)	0 / 29 / 6	0 / 30 / 5	0 / 32 / 4	8 / 16 / 4
Stenosierungsgrad % (25.& 75. Quartil)	-	50.0 (32.0 – 60.0)	85.0 (82.5 – 87.5)	80.0 (63.8 – 80.0)

**Tabelle 3** – Erkrankungsübersicht aller Arteriosklerose-Patienten. Bei Patienten mit mehreren arteriosklerotischen Manifestationen hatte die Erkrankung in der Vorgeschichte schon einmal eine Rolle gespielt, trug aber nicht zum aktuellen Aufenthalt bei.

## 9.2 Untersuchung der Risikofaktoren der Patienten

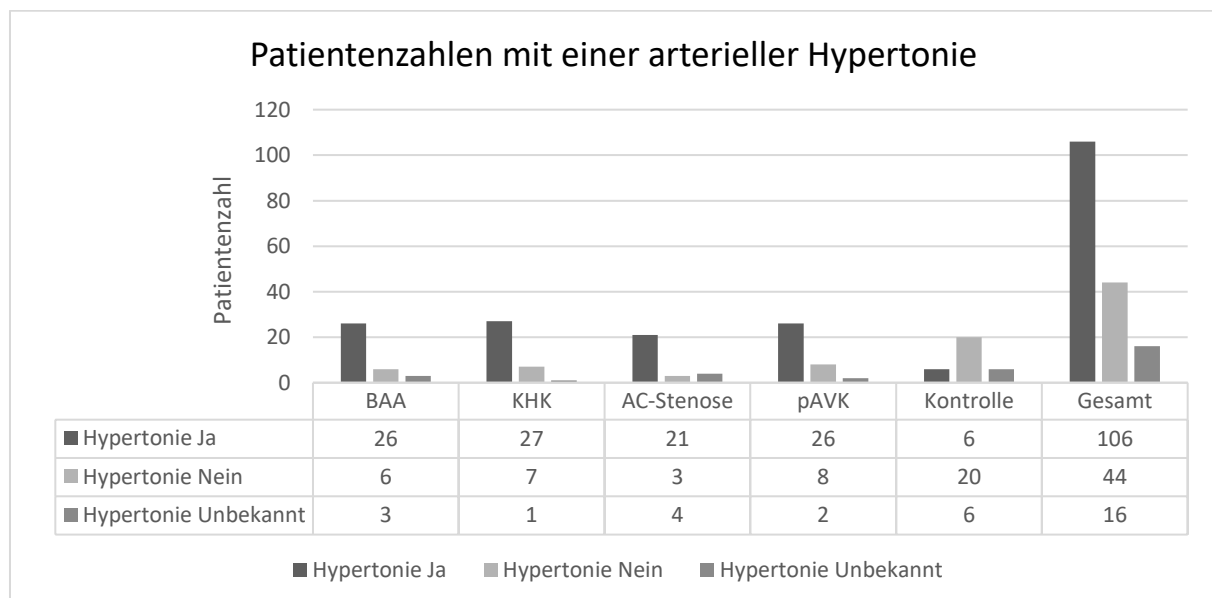
Mit Studieneinschluss erfolgte ein Anamnesegegespräch, in welchem Risikofaktoren für das Vorliegen einer arteriosklerotischen Erkrankungen abgefragt und protokolliert wurden.

Folgende Risikofaktoren sind dabei erhoben worden:

- Geschlecht
- Patientenalter  $\geq 70$  Jahre
- arterielle Hypertonie
- Diabetes mellitus
- BMI-Wert  $\geq 30$
- bestehender / stattgehabter Nikotinabusus

### 9.2.1 Arterielle Hypertonie

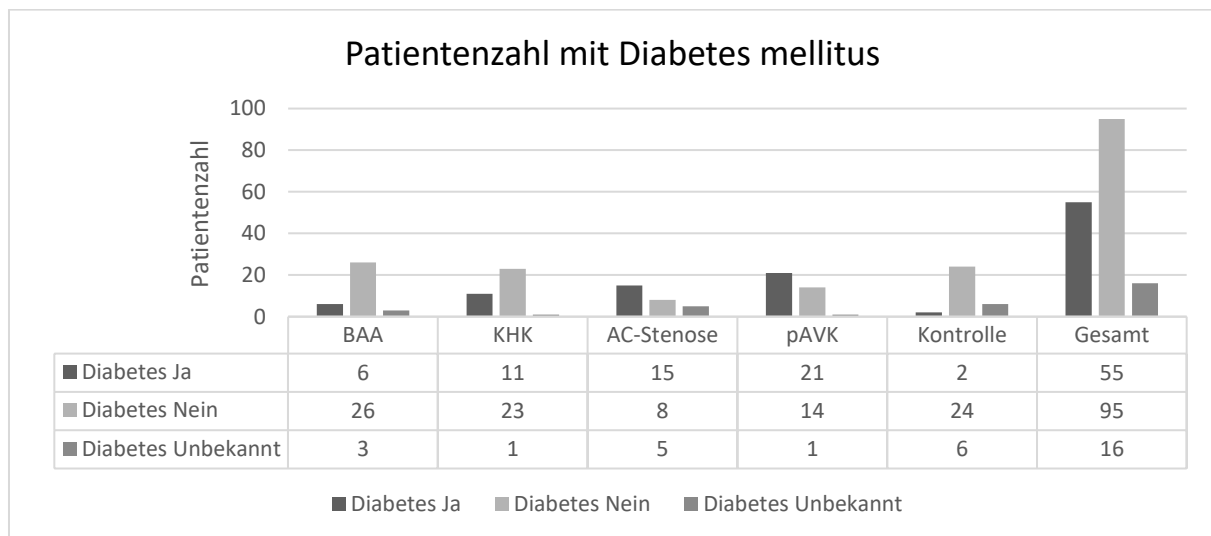
Bei 75,3% der Patienten mit einer Arteriosklerose-bedingten Erkrankung war zum Studieneinschluss ein arterielle Hypertonus bekannt (Abbildung 3). Dabei war die Verteilung in den untersuchten Subgruppen nahezu identisch. Lediglich die Kontrollgruppe zeigt einen deutlich geringeren Anteil an Hypertonikern.



**Abbildung 3** – Anzahl der Patienten mit dem Risikofaktor "arterielle Hypertonie" zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses.

## 9.2.2 Diabetes mellitus

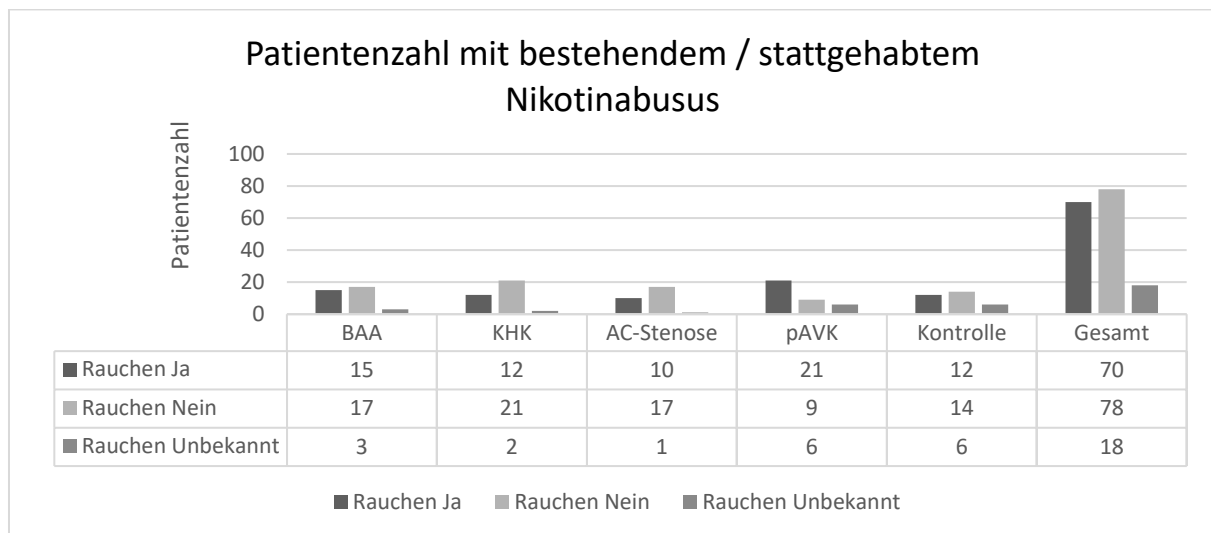
Bei der Datenerhebung für das Erkrankungsbild „Diabetes mellitus“ wurde nicht zwischen den unterschiedlich bekannten Diabetestypen unterschieden. In den Patientengruppen „Karotisstenose“ und „pAVK“ finden sich die größten Anteile an Diabetikern. In den Patientengruppe „BAA“ und in der Kontrollgruppe hatten die wenigstens Patienten einen bekannten Diabetes mellitus in der Vorgeschichte.



**Abbildung 4** – Anzahl der Patienten mit dem Risikofaktor „Diabetes mellitus“ zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses.

## 9.2.3 Nikotinabusus

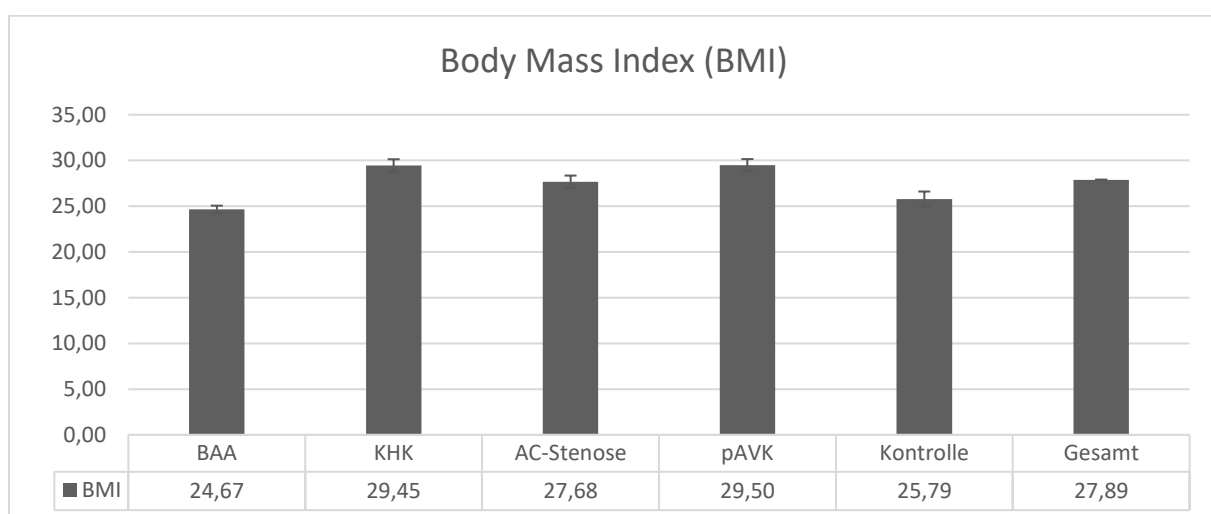
Beim Risikofaktor Nikotinabusus zeigt sich folgende Verteilung: Die Patientengruppe „pAVK“ zeigt den größten Anteil mit etwa 60%. Auch in der „BAA“-Gruppe konnte mit ca. 40% im Vergleich zu den anderen Patientengruppen ein verstärkter Nikotinabusus festgestellt werden. Betrachtet man die restliche Kohorte der Arteriosklerosepatienten, ist eine recht ausgeglichene Verteilung zwischen Rauchern und Nicht-Rauchern zu erkennen (Abbildung 5).



**Abbildung 5** – Anzahl der Patienten mit dem Risikofaktor „Nikotinabusus“ zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses. Hier erfolgte keine Differenzierung zwischen einem aktiven oder nicht-aktivem Nikotinabusus.

## 9.2.4 Body Mass Index

In Abbildung 6 sind die BMI-Mittelwerte der Patienten in den arteriosklerotischen Subgruppen und der Kontrollgruppe angegeben. Die Patientengruppe „BAA“ (24,67) sowie die Kontrollgruppe (25,79) weisen die niedrigsten BMI-Mittelwerte auf, wobei der Mittelwert in der Gruppe „BAA“ sogar noch etwas kleiner ausfällt. Der höchste Mittelwert findet sich bei der Patientengruppe mit einer KHK.

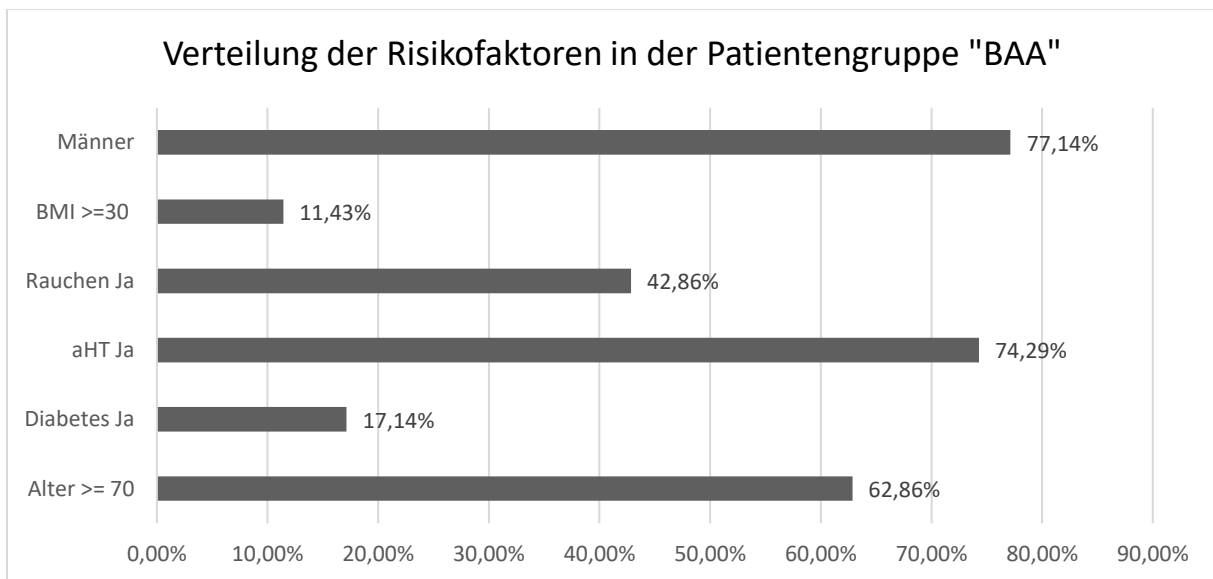


**Abbildung 6** – BMI-Mittelwerte der untersuchten Patientengruppen.

### 9.2.5 Die Risikofaktoren innerhalb der Subgruppen

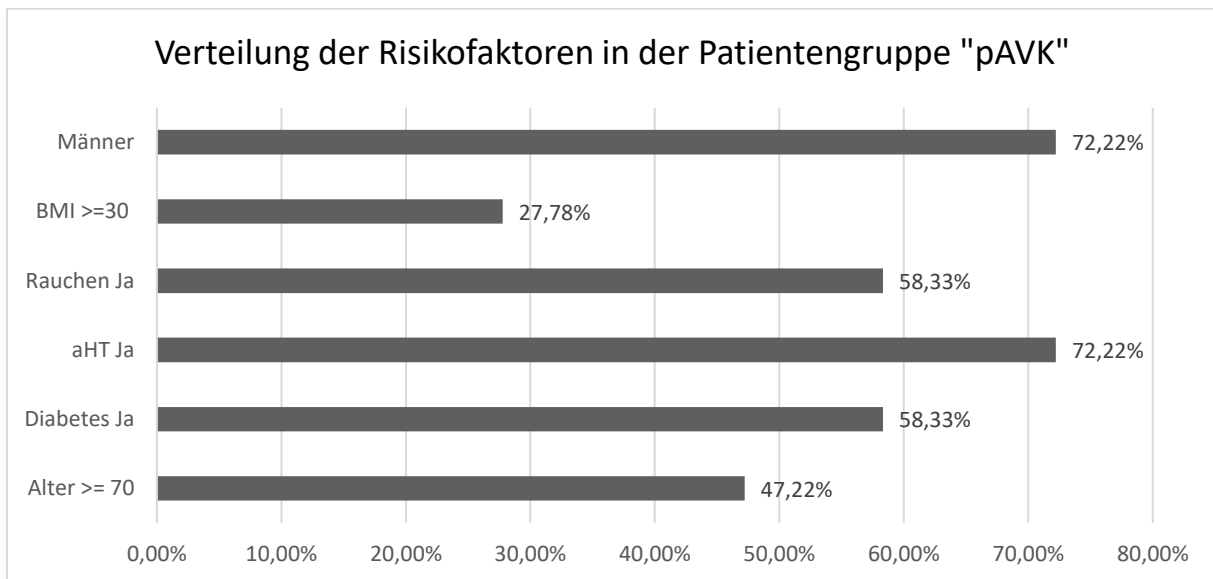
Die folgenden Diagramme (Abbildung 7-10) zeigen das prozentuale Vorkommen der erhobenen Risikofaktoren innerhalb der einzelnen Patientengruppen. Für die Risikofaktoren „Alter“ und „BMI“ wurde jeweils ein Cut-off gesetzt: Ein Risikofaktor wurde ab einem Patientenalter  $\geq 70$  Jahre und ein BMI von  $\geq 30$  als vorhanden gewertet.

Nahezu jeder dritte Patient in der BAA-Gruppe (Abbildung 7) erfüllte die Kriterien für das Vorliegen der Risikofaktoren „männliches Geschlecht“ und/oder „arterielle Hypertonie“. Zudem ist etwas mehr als die Hälfte aller Patienten mit einem abdominellen Aneurysma 70 Jahre oder älter. Bei etwa 40% der Patienten in der BAA-Gruppe liegt ein Nikotinabusus vor. Der Anteil an Patienten mit einem BMI  $\geq 30$  fällt im Vergleich mit den anderen Gruppen geringer aus.



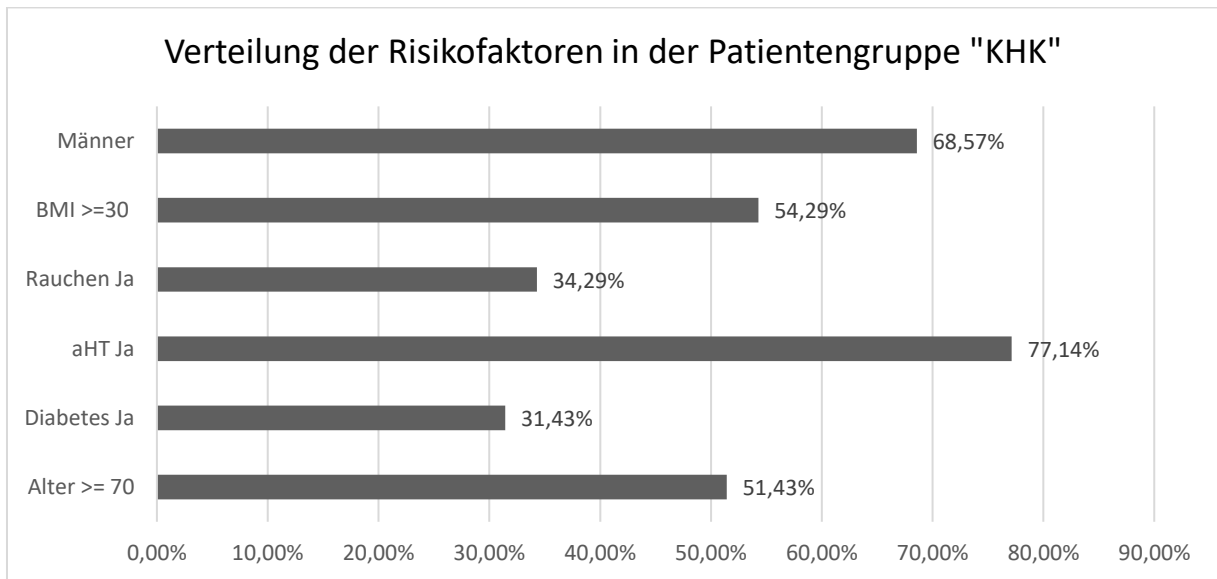
**Abbildung 7** – Anteil der Patienten in % mit den untersuchten Risikofaktoren innerhalb der BAA-Patientengruppe.

Der Anteil an männlichen Patienten und der Anteil an Patienten mit einer arteriellen Hypertonie liegt in der pAVK-Gruppe (Abbildung 8) jeweils über 70%. Etwa 60% der pAVK-Studiengruppe haben einen bekannten Diabetes mellitus und/oder einen Nikotinabusus. Knapp die Hälfte der Patientengruppe ist zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses 70 Jahre oder älter und etwa ein Drittel der pAVK-Gruppe hat einen BMI von  $\geq 30$ .



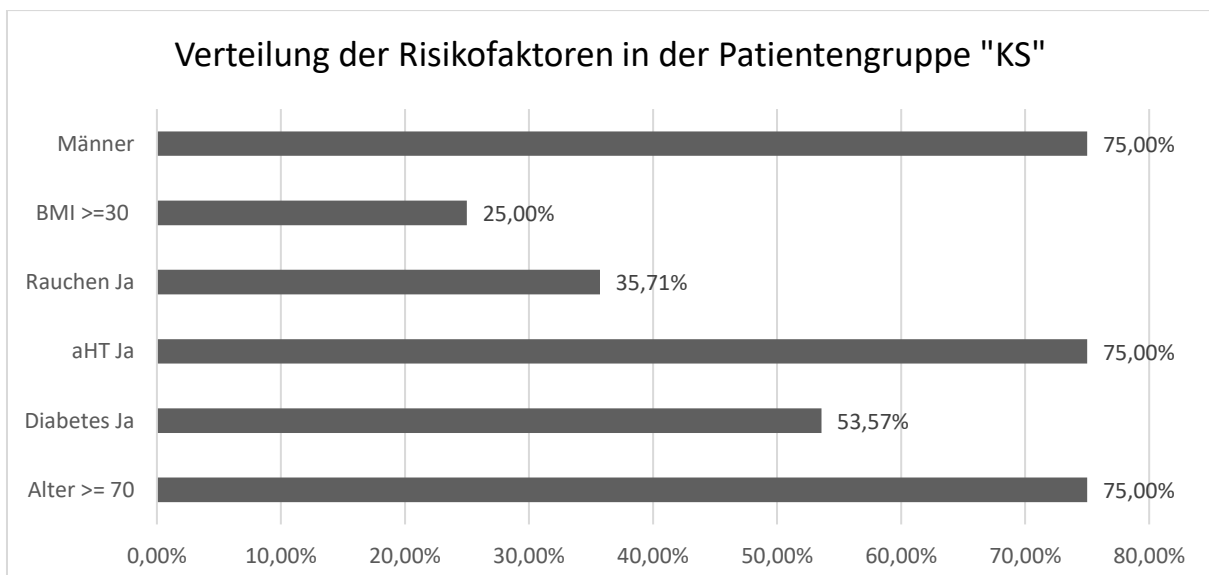
**Abbildung 8** – Anteil der Patienten in % mit den untersuchten Risikofaktoren innerhalb der pAVK-Patientengruppe.

Wie in den beiden Gruppen zuvor liegt auch hier (Abbildung 9) der Anteil der Männer in der untersuchten Gruppe bei etwa 70%. Nahezu 80% aller Patienten in der KHK-Gruppe weisen einen arteriellen Hypertonus auf. Der Anteil an Patienten mit einem Alter von 70 Jahren oder älter sowie der Anteil an Patienten mit einem BMI  $\geq 30$  liegt bei etwas über 50%. Der Anteil an Rauchern und an Diabetikern bei etwas über 30%.



**Abbildung 9** – Anteil der Patienten in % mit den untersuchten Risikofaktoren innerhalb der KHK-Patientengruppe.

In der Patientengruppe mit einer Karotisstenose liegt der Gesamtanteil der Männer von Patienten mit einer arteriellen Hypertonie und einem Patientenalter  $\geq 70$  Jahren bei jeweils 75%. Etwas mehr als die Hälfte aller KS-Patienten hat einen bekannten Diabetes mellitus. Der Anteil an Rauchern liegt bei 35% und der Patientenanteil mit einem BMI  $\geq 30$  liegt bei 25%.

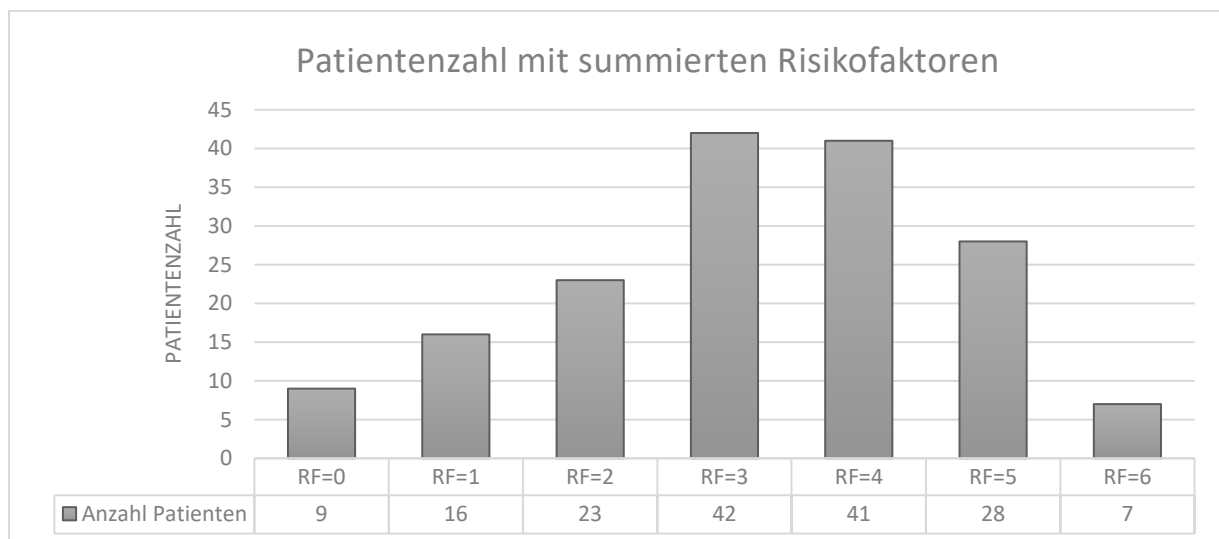


**Abbildung 10** – Anteil der Patienten in % mit den untersuchten Risikofaktoren innerhalb der Karotisstenosen-Patientengruppe.

## 9.2.6 Kardiovaskuläre Risikofaktoren der Patientengruppen

Die folgenden Balkendiagramme zeigen die Anzahl der Patienten zusammen mit der summierten Zahl der vorliegenden Risikofaktoren – einmal zur Übersicht für das gesamte Patientenkollektiv (Abbildung 11) und zusätzlich als Überblick für jede einzelne Patientengruppe (Abbildung 12).

Mehr als 65% aller Studienteilnehmer weisen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses drei oder mehr Risikofaktoren für eine arteriosklerotische Erkrankung auf. Neun Patienten weisen keine vorhandenen Risikofaktoren (RF=0) auf, wobei sieben der neun Patienten aus der Kontrollgruppe stammen (Abbildung 12). Sieben Patienten erfüllen sogar alle sechs anamnestisch erhobenen Risikofaktoren (RF=6) – drei Patienten in der pAVK-Gruppe und drei Patienten in der Karotisstenose-Gruppe. Ein Patient findet sich in der Gruppe der Patienten mit einem BAA. Die Patienten in der Kontrollgruppe weisen insgesamt deutlich weniger Risikofaktoren auf.



**Abbildung 11** – Summation der vorliegenden Risikofaktoren (RF) des gesamten Patientenkollektivs.

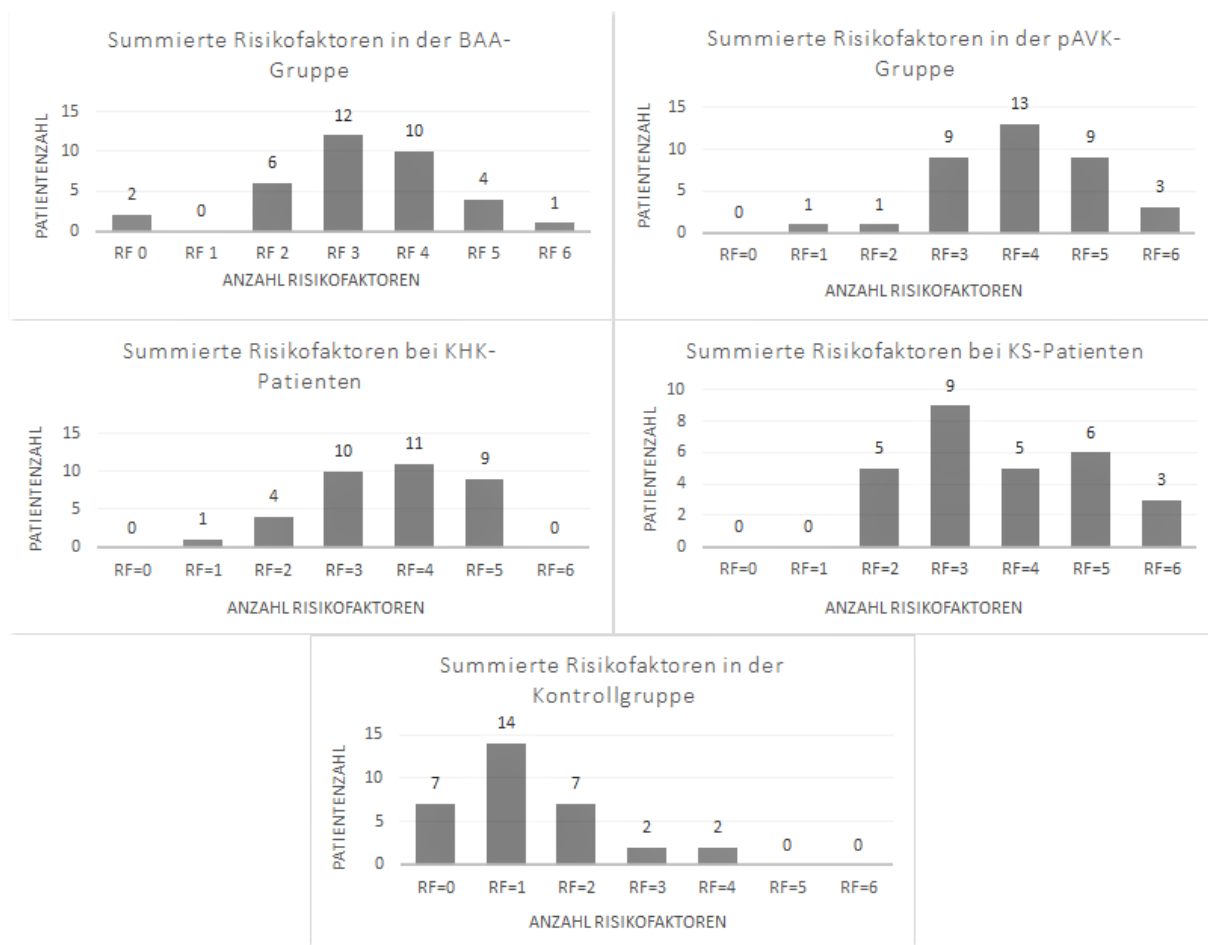


Abbildung 12 – Häufung der vorliegenden Risikofaktoren (RF) in jeder einzelnen Patientengruppe.

### 9.3 Sequenzierung der Patienten-Serumproben

Die Analyse der insgesamt 166 Serumproben erfolgte in vier Sequenzierungsläufen (Tabelle 4). Dabei wurde – sofern möglich – auf eine gleiche Verteilung der Sub- und Kontrollgruppen über die vier Läufe geachtet mit dem Ziel einen Batch-Effekt zu vermeiden. Insgesamt konnten 2165 unterschiedliche miRNAs gefunden werden. Neun Serumproben mit einem unzureichendem Sequenzierungsergebnis wurden aus der weiteren Analyse entnommen. Als Schwellenwert für die Aussortierung wurden mindestens 500.000 Reads und ein Anteil von mindestens 7% an miRNAs im Verhältnis zum gefundenen Gesamtmaterial festgelegt. Der festgelegte Schwellenwert hat sich bereits in anderen Arbeiten als guter Cutoff bewährt.<sup>47</sup> Dieser Arbeitsschritt reduzierte die Anzahl auf 2165 miRNAs bei verbliebenen 145 Proben (Tabelle 4). Die Sequenzierungsqualität wurde für jede Probe mit FastQC überprüft. Für alle Datensätze hatte die Sequenzqualität einen Phred-Score von über 32.

Gruppe	Sequenzierungs- lauf 1 vor   nach Filterung	Sequenzierungs- lauf 2 vor   nach Filterung	Sequenzierungs- lauf 3 vor   nach Filterung	Sequenzierungs- lauf 4 vor   nach Filterung
BAA	13   13	8   7	5   4	9   6
KHK	14   14	7   7	7   6	7   6
CS	10   10	10   9	4   3	4   3
pAVK	11   11	7   5	7   7	11   6
Kontrolle	0   0	16   16	7   7	9   5

**Tabelle 4** – Zusammenfassung der verwendeten Proben vor und nach der Entfernung von Proben unterhalb des Schwellenwertes.

## 9.4 Vergleich der miRNA-Expressionsmuster zwischen der Kontrollgruppe und Patienten mit einer arteriosklerotischen Erkrankung

Für die Expression der arteriosklerotischen miRNA-Profile ist von unserer Arbeitsgruppe bereits eine Publikation erfolgt.<sup>47</sup> Der Vergleich der miRNA-Expressionsprofile zwischen der Kontrollgruppe und dem Gesamtkollektiv an Patienten mit einem arteriosklerotisch Erkrankungsbild mittels einer DGE-Analyse (Standard-Cut-Off, angepasster p-Wert < 0,1) ergab 114 unterschiedliche exprimierte miRNA's. Eine im Anschluss erfolgte Filterung der Ergebnisse (Filterkriterien:  $\log_2FC \geq 1$ , korrigierter p-Wert  $\leq 0,1$  und Basismittelwert  $\geq 50$ ). Die Anwendung des Filters ergab 12 unterschiedliche miRNAs beim Vergleich der beiden Gruppen (Tabelle 5). Dabei lag der mittlere  $\log_2FC$  beim Vergleich der Patientengruppe mit einer atherosklerotischen Erkrankung und der Kontrollgruppe bei  $1,38 \pm 0,31$ . Dabei waren 8 miRNAs hochreguliert und 4 miRNAs runterreguliert.<sup>47</sup>

Der „Fold Change“ ist im Rahmen von Genexpressionsanalysen ein gängiger Begriff, um Veränderungen im Expressionsniveau eines Gens zu messen. Die Angabe werden in der Bioinformatik am häufigsten mit dem Logarithmus zur Basis 2 angegeben, da er leichter zu interpretieren ist als die Veränderung der Expression in der ursprünglichen Skalierung anzugeben und führt letztendlich zu einer vereinfachten und ästhetisch anspruchsvolleren Darstellung. So entspricht eine Verdopplung der ursprünglichen Skalierung einer logarithmischen 2-fachen Veränderung von 1 und eine Vervierfachung des Expressionsniveaus einer 2-fachen logarithmischen Veränderung von 2. Wenn die Veränderung abnimmt, dann entspricht beispielweise eine Halbierung einer 2-fachen logarithmischen Veränderung von -1 und eine Viertel des Ausgangswerts einer Veränderung von -2.<sup>48</sup>

miRNAs	Log2FC	p-Wert	p-Wert (korr.)
miR-193a-5p	1.66	1.23E-11	8.55E-09
miR-27a-5p	1.05	1.76E-03	2.65E-02
miR-3168	1.58	1.35E-03	2.28E-02
miR-320a-3p	1.23	5.95E-06	4.60E-04
miR-320b	1.19	1.15E-05	8.00E-04
miR-320d	1.51	1.22E-06	1.69E-04
miR-378d	1.11	9.63E-05	3.82E-03
miR-4433b-3p	-1.25	3.34E-04	8.57E-03
miR-483-5p	1.35	4.11E-03	4.45E-02
miR-495-3p	-1	4.20E-04	9.46E-03
miR-543	-1.04	6.35E-05	3.01E-03
miR-576-3p	1.24	5.57E-08	1.29E-05

**Tabelle 5** – DEG mit gefilterten Cut-offs. Vergleich zwischen Gruppe Arteriosklerose vs. Kontrollgruppe. MW = Mittelwert. <sup>47</sup>

Ein Vergleich der einzelnen Erkrankungsgruppen mit der Kontrollgruppe unter den oben bereits verwendeten Filterkriterien ergab folgende Zahlen differenziert veränderter miRNA-Expression:

**Aneurysma vs. Kontrollgruppe:** 14 miRNAs

**KHK vs. Kontrollgruppe:** 10 miRNAs

**Karotisstenose vs. Kontrollgruppe:** 10 miRNAs

**pAVK vs. Kontrollgruppe:** 13 miRNAs

Insgesamt konnten gruppenübergreifend 27 unterschiedlich exprimierte miRNAs gefunden werden. Die beiden miRNAs miR-193a-5p und miR-320d weisen in allen untersuchten Erkrankungsgruppen eine veränderte Expression gegenüber der Kontrollgruppe auf. <sup>47</sup>

Beim Vergleich der Aneurysma-Patientengruppe mit der Kontrollgruppe sind die beiden miRNAs um ein vierfaches erhöht. In der pAVK-Patientengruppe ist die miR-193a-5p ebenfalls nahezu um ein vierfaches erhöht. Diese sind zusammen mit ihren log2FC-Werten in Abbildung 13 graphisch dargestellt.

### BAA vs. Kontrollgruppe

miRNAs BAA vs. Kontrollgruppe	log2FC	p-Wert	p-Wert (korr.)
hsa-miR-122-5p	1.1	5.43E-03	5.04E-02
hsa-miR-193a-5p	1.97	2.40E-11	1.25E-08
hsa-miR-2110	1.03	1.87E-05	7.30E-04
hsa-miR-27a-5p	1.57	7.75E-05	1.92E-03
hsa-miR-320a-3p	1.41	2.11E-05	7.30E-04
hsa-miR-320b	1.51	4.45E-06	2.94E-04
hsa-miR-320c	2	5.63E-07	5.85E-05
hsa-miR-320d	1.94	2.48E-07	3.22E-05
hsa-miR-378d	1.53	6.97E-06	4.03E-04
hsa-miR-4433b-3p	-1.4	9.69E-04	1.68E-02
hsa-miR-483-5p	1.76	2.18E-03	2.70E-02
hsa-miR-543	-1.09	7.03E-04	1.26E-02
hsa-miR-576-3p	1.57	7.13E-09	1.24E-06
hsa-miR-629-5p	1.2	1.18E-06	1.02E-04

**Tabelle 6** – Gruppenspezifisch exprimierte miRNAs. Hier im Vergleich BAA zu der Kontrollgruppe. <sup>47</sup>

Von den 14 spezifischen miRNAs in der Patientengruppen BAA wiesen 12 miRNAs eine vermehrte Expression auf und 2 miRNAs eine verminderte Expression beim Vergleich mit den Patienten aus der Kontrollgruppe. Die miR-193-5p zeigte eine fast 4-fache Steigerung seiner Expression (Tabelle 6).

**KHK vs. Kontrollgruppe**

miRNAs KHK vs. Kontrollgruppe	log2FC	p-Wert	p-Wert (korr.)
hsa-miR-193a-5p	1.23	1.93E-05	0.00289
hsa-miR-320a-3p	1.04	1.31E-03	0.02696
hsa-miR-320b	1	1.93E-03	0.03586
hsa-miR-320d	1.23	8.42E-04	0.01865
hsa-miR-370-3p	-1.22	1.48E-04	0.0074
hsa-miR-378d	1.02	2.40E-03	0.03954
hsa-miR-409-3p	-1.24	5.08E-05	0.00607
hsa-miR-493-3p	-1.22	5.39E-04	0.01666
hsa-miR-495-3p	-1.16	7.12E-04	0.01793
hsa-miR-543	-1.09	5.57E-04	0.01666

**Tabelle 7** – Gruppenspezifisch exprimierte miRNAs. Hier im Vergleich KHK zu der Kontrollgruppe. <sup>47</sup>

In der KHK-Gruppe war die Expression von 5 miRNAs hochreguliert und von 5 miRNAs herunterreguliert (Tabelle 7). In der Patientengruppe Karotisstenose waren 7 der 10 gefundenen miRNAs herunterreguliert (Tabelle 8).

**Karotisstenose vs. Kontrollgruppe**

miRNAs Karotisstenose vs. Kontrollgruppe	log2FC	p-Wert	p-Wert (korr.)
hsa-miR-193a-5p	1.36	7.11E-06	0.00542
hsa-miR-27a-5p	1.15	5.00E-03	0.08657
hsa-miR-320d	1.14	3.24E-03	0.06682
hsa-miR-335-3p	-1.03	5.22E-04	0.03615
hsa-miR-381-3p	-1.15	2.77E-04	0.03615
hsa-miR-493-3p	-1.05	4.72E-03	0.08358
hsa-miR-493-5p	-1.27	1.17E-03	0.04529
hsa-miR-495-3p	-1.16	1.39E-03	0.04529
hsa-miR-543	-1.08	1.13E-03	0.04529
hsa-miR-654-3p	-1.14	6.19E-04	0.03931

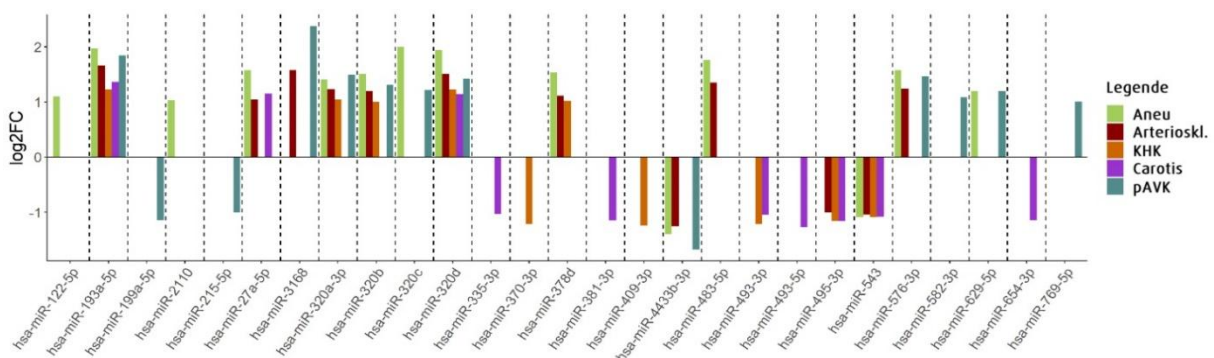
**Tabelle 8** – Gruppenspezifisch exprimierte miRNAs. Hier im Vergleich Karotisstenose zu der Kontrollgruppe. <sup>47</sup>

**pAVK vs. Kontrollgruppe**

miRNAs pAVK vs. Kontrollgruppe	log2FC	p-Wert	p-Wert (korr.)
hsa-miR-193a-5p	1.84	6.22E-10	3.98E-07
hsa-miR-199a-5p	-1.14	3.31E-05	2.65E-03
hsa-miR-215-5p	-1.01	1.27E-04	5.09E-03
hsa-miR-3168	2.38	7.20E-05	4.19E-03
hsa-miR-320a-3p	1.49	7.07E-06	7.54E-04
hsa-miR-320b	1.31	8.15E-05	4.35E-03
hsa-miR-320c	1.22	2.45E-03	4.49E-02
hsa-miR-320d	1.42	1.81E-04	6.51E-03
hsa-miR-4433b-3p	-1.68	9.01E-05	4.44E-03
hsa-miR-576-3p	1.46	1.07E-07	3.41E-05
hsa-miR-582-3p	1.08	4.23E-04	1.13E-02
hsa-miR-629-5p	1.2	1.35E-06	2.15E-04
hsa-miR-769-5p	1.01	3.36E-03	5.24E-02

**Tabelle 9** – Gruppenspezifisch exprimierte miRNAs. Hier im Vergleich pAVK zu der Kontrollgruppe. <sup>47</sup>

Beim Vergleich der pAVK-Patientengruppe mit der Kontrollgruppe konnte festgestellt werden, dass die Expression von 10 der 13 pAVK-spezifischen miRNAs hochreguliert war und 3 miRNAs eine verminderte Expression gezeigt haben. Die miR-3168 war im Gruppenvergleich dabei fast um das 5-fach erhöht.



**Abbildung 13** – Grafische Darstellung der log2FC-Werte der gefilterten miRNAs. Dargestellt sind hier die Unterschiede zwischen allen Erkrankungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. <sup>47</sup>



## 9.5 Differenzielle Expressionsanalyse als primärer Auswertungsansatz

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der differentiellen Expressionsanalyse (DEG-Analyse) der zirkulierenden miRNAs zwischen Patienten mit einer arterioskleroseassoziierten Erkrankung und der gesunden Kontrollgruppe. Dieser Ansatz wurde bewusst so gewählt, da er im Gegensatz zu reinen Mittelwertvergleichen eine statistisch robuste Identifikation konsistent regulierter miRNAs erlaubt und dabei sowohl eine Streuung als auch eine multiple Testung berücksichtigt. Die DEG-Analyse ermöglicht es miRNAs zu identifizieren die systematisch mit arteriosklerotischen Manifestationen assoziiert sind. Durch die Anwendung etablierter statistische Korrekturverfahren konnte sichergestellt werden, dass die berichteten Effekte nicht zufälligen Schwankungen beruhen, sondern reproduzierbare Expressionsunterschiede widerspiegeln.

## 9.6 Einordnung der Mittelwertanalysen als ergänzende Zusatzanalyse

Ergänzend zur durchgeführten DEG-Analyse sind Mittelwertvergleiche der miRNA-Expression durchgeführt worden. Dabei lag der Fokus auf zwei untersuchte miRNAs: die miR-193a-5p und die miR-320d, da diese beiden miRNAs im Rahmen der DEG-Analyse in allen Subgruppen im direkten Gruppenvergleich mit der Kontrollgruppe eine verstärkte Expression aufweisen konnten. Diese Mittelwertanalysen dienen ausdrücklich nicht der primären Hypothesenüberprüfung, sondern wurden als deskriptive Zusatzinformation eingesetzt, um die Richtung und die Größenordnung der durch die DEG-Analyse identifizierten Effekte anschaulich zu unterstützen.

Im Vergleich zur DEG-Analyse sind Mittelwertanalysen methodisch limitiert, dass sie keine multiple Testkorrektur, keine Modellierung der Varianzstruktur und keine Gewichtung einzelner Proben vornehmen. Entsprechend können sie stärker durch Ausreißer und

Stichprobenumfang beeinflusst werden, weshalb die Ergebnisse der Mittelwertanalysen ausschließlich als ergänzende Darstellung interpretiert werden sollen.

Die erhobenen Expressionsdaten wurden zunächst mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung überprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Für die Expression der miR-193a-5p ergab der Test sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe der Arteriosklerosepatienten keinen signifikanten Unterschied zur Normalverteilung ( $p > 0,05$ ), sodass in beiden Gruppen von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann. Daher konnten für die Gruppenvergleiche der Students-t-Test für den Zweistichprobenvergleich und für die Subgruppenvergleiche der one-way ANOVA-Test angewendet werden. Die Analyse bestätigte das Ergebnis der DEG-Analyse und ergab bei den erkrankten Probanden eine nahezu doppelt so hohe Expression wie in der Kontrollgruppe.

Auch für die Expression der miR-320d wurde eine Mittelwertanalyse durchgeführt. Zuvor erfolgte ebenfalls eine Prüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test ( $\alpha = 0,05$ ). Dabei zeigte sich, dass die Annahme einer Normalverteilung für die Arteriosklerosegruppe verworfen werden muss ( $p < 0,05$ ). Zusätzlich wurden die vier Subgruppen der Arteriosklerosepatienten (BAA, KHK, KS und pAVK) separat auf Normalverteilung untersucht. Für die pAVK-Gruppe konnte ebenfalls keine Normalverteilung angenommen werden ( $p < 0,05$ ), während für die übrigen drei Gruppen eine Normalverteilung vorlag ( $p > 0,05$ ). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für Vergleiche mit Beteiligung der pAVK-Gruppe nicht-parametrische Testverfahren angewendet (Mann-Whitney-U-Test bei Zweistichprobenvergleichen sowie Kruskal-Wallis-Test bei Gruppenvergleichen). Für die übrigen Gruppen wurden parametrische Tests verwendet, namentlich der Student-t-Test bei Zweistichprobenvergleichen sowie die einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) bei Gruppenvergleichen.

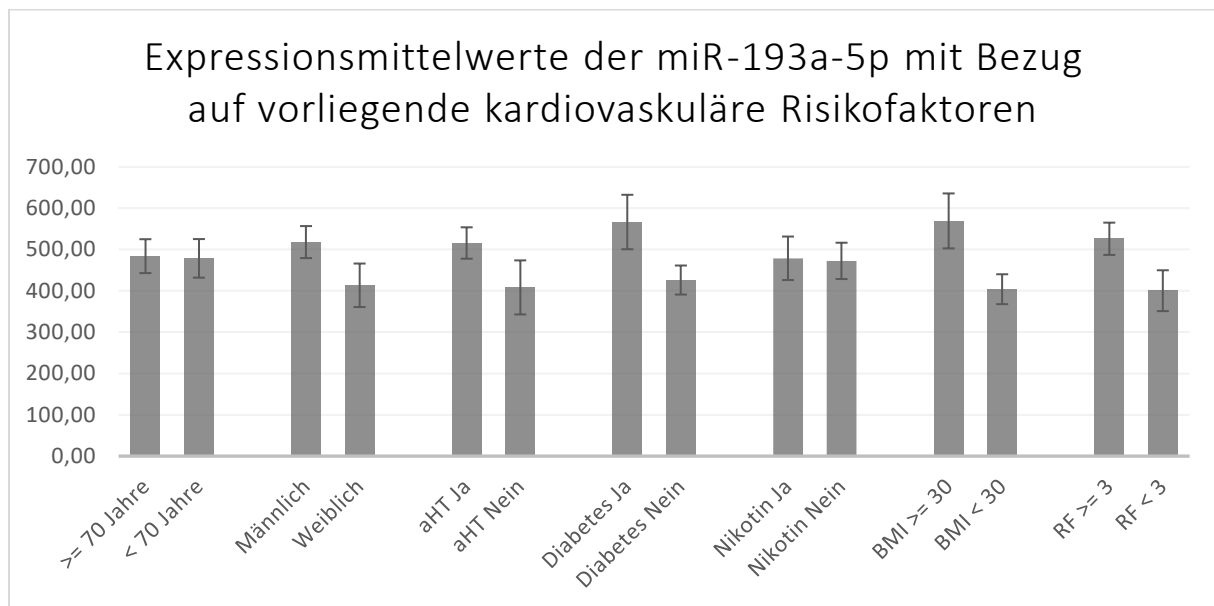
Die ergänzend durchgeführten Mittelwertanalysen zeigten sowohl für die miR-193a-5p als auch für die miR-320d insgesamt erhöhte mittlere Expressionswerte beim arteriosklerotischen Patientenkollektiv im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Richtung der Mittelwertunterschiede entsprach damit den Ergebnissen der differenziellen Analysen. Gleichzeitig war in beiden Fällen eine ausgeprägte individuelle Streuung der Messwerte erkennbar, was die Heterogenität der untersuchten Population widerspiegelt.

Beim Vergleich der Mittelwerte mit den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren zeigte sich kein einheitliches, klar trennbares Muster.

Folgende Risikofaktoren wurden in dieser Analyse untersucht:

- Patientenalter  $\geq 70$
- Geschlecht
- arterielle Hypertonie
- Diabetes mellitus
- stattgehabter oder bestehender Nikotinabusus
- BMI  $\geq 30$
- Mittelwertanalyse für mehrfach bzw. zeitgleich vorliegende Risikofaktoren

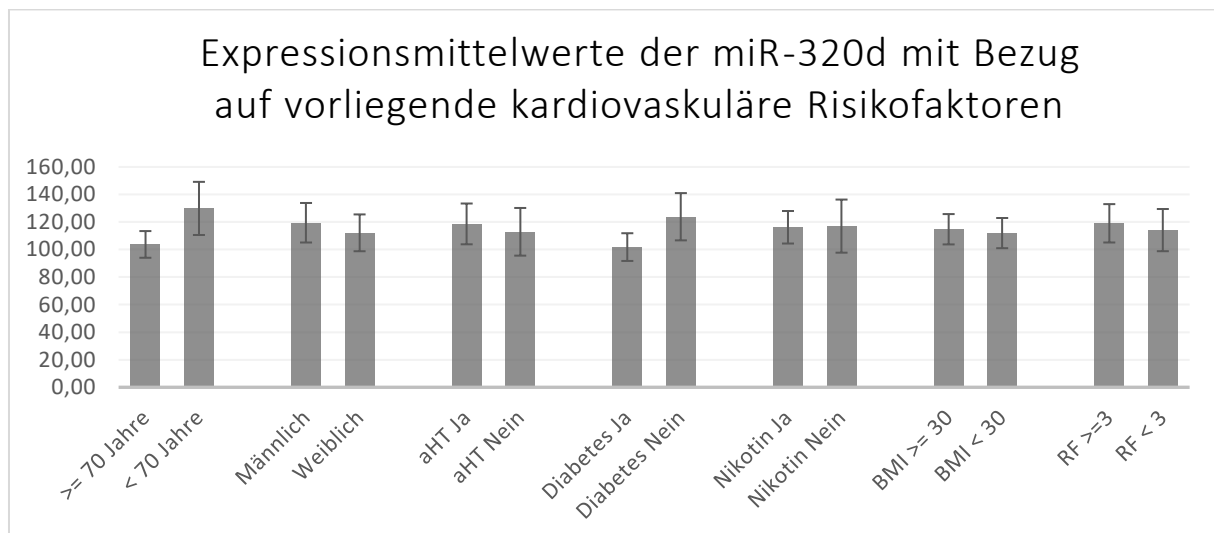
Vielmehr zeigte sich für beide miRNAs eine Tendenz für einen Zusammenhang der hier untersuchten miRNAs mit einer Akkumulation mehrerer Risikofaktoren. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Abbildungen 15 und 16 und die Tabellen 10 und 11 zu entnehmen.



**Abbildung 15** - Mittelwertanalyse für die Expression der miR-193a-5p mit Bezug auf die erhobenen Risikofaktoren – inkl. Standardfehler. RF >=3: Anzahl von 3 oder mehr gleichzeitig vorliegenden Risikofaktoren.

Patienten >= 70 Jahre vs. Patienten < 70 Jahre	p = 0.938
Männlich vs. weiblich	p = 0.129
Arterielle Hypertonie vs. keine arterielle Hypertonie	p = 0.181
Diabetes vs. kein Diabetes	p = 0.082
Nikotinabusus vs. kein Nikotinabusus	p = 0.931
BMI >= 30 vs. BMI < 30	p = 0.058
>=3 RF vs. <3 RF	p = 0.059

**Tabelle 10** – p-Werte der t-test-Statistik beim Vergleich der miRNA-Expression der miRNA-193a-5p zwischen den Patienten mit vorhandenem Risikofaktor und ohne vorhandenen Risikofaktor.



**Abbildung 16** - Mittelwertanalyse für die Expression der miR-320d mit Bezug auf die erhobenen Risikofaktoren – inkl. Standardfehler. RF >=3: Anzahl von 3 oder mehr gleichzeitig vorliegender Risikofaktoren.

Patienten über 70 Jahre vs. Patienten unter 70 Jahre	p = 0.421
Männlich vs. weiblich	p = 0.798
Arterielle Hypertonie vs. keine arterielle Hypertonie	p = 0.366
Diabetes vs. kein Diabetes	p = 0.873
Nikotinabusus vs. Nichtraucher	p = 0.474
BMI über 30 vs. BMI unter 30	p = 0.634
Drei oder mehr RF vs. weniger als 3 RF	p = 0.738

**Tabelle 11** – p-Werte der t-test-Statistik bei den Vergleichen der miRNA-Expression für die miR-320d in Bezug auf die erhobenen Risikofaktoren.

Aufgrund der fehlenden multiplen Testkorrektur und der hohen Varianz sind die Mittelwertanalysen weder für die miR-193a-5p noch für die miR-320d als eigenständiger statistische Nachweis zu interpretieren. Ihr Beitrag liegt vielmehr in der deskriptiven Einordnung und unterstützen damit die Ergebnisse der DEG-Analyse indem sie zeigen, dass die identifizierten miRNAs auch auf Mittelwertebene mit arteriosklerotischen Erkrankungen und der Präsenz kardiovaskulärer Risikofaktoren assoziiert sind. Die zentrale Evidenz dieser Arbeit bleibt jedoch die robuste DEG-Analyse, auf dessen Grundlage auch die nachfolgende Diskussion erfolgt.

## 10. Diskussion

### 10.1 Kritisches Reassessment des Studiendesigns und der Methodik

Im Rahmen dieser Studie wurden aus dem Blutserum von insgesamt 134 Probanden mit einer arteriosklerotischen Erkrankung miRNA-Expressionsprofile herausgefiltert und analysiert.

Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf vier unterschiedliche Krankheitsbilder gelegt:

- Bauchaortenaneurysma (BAA)
- Karotisstenose (KS)
- Koronare Herzkrankheit (KHK)
- Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)

Um einen Vergleich herstellen zu können, wurden zusätzlich miRNA-Expressionsprofile von 32 gesunden Patienten untersucht (Kontrollgruppe). Dabei erfolgte sowohl ein Vergleich der miRNA-Expression der einzelnen Erkrankungsgruppen untereinander als auch mit der Kontrollgruppe. Ziel der Studie war es spezifische miRNA-Profile oder auch einzelne spezifische miRNAs als potenzielle Biomarker zur Identifikation spezieller arteriosklerotischer Prozesse, Krankheiten und Risikoprofile zu identifizieren. Mit einer Studienstärke von 134 Patienten wurde eine gute Grundlage für eine signifikante Aussagekraft gelegt. In vergleichbaren Arbeitsgruppen wurde mit deutlich kleineren Kohorten gearbeitet.<sup>49</sup> Es finden sich jedoch auch Studien mit einer deutlich größeren Teilnehmerzahl – allerdings bezog sich das Studiendesign dann zumeist auf ein einzelnes Krankheitsbild oder auf die Untersuchung von einzelnen, spezifischen miRNAs.<sup>50</sup>

Das Krankheitsbild „Arteriosklerose“ ist eine systemische Erkrankung, die sich über einen langen Zeitraum entwickelt und erst in einem fortgeschrittenen Stadium klinische Manifestationen aufweist. Trotz intensiver Bemühungen im Rahmen der Patientenrekrutierung ein Patientenkollektiv mit einem isolierten, arteriosklerotischen Krankheitsbild herauszufiltern,

ist ein vollständiger Ausschluss von weiteren, in dieser Studie ebenfalls untersuchten Krankheitsbildern nahezu unmöglich. Obwohl heutzutage im klinischen Alltag versucht wird durch Screeningverfahren eine Krankheitsfrüherkennung zu ermöglichen (Ultraschall der Karotiden, Ultraschall der Aorta abdominalis), kommt es häufig erst zur Diagnosestellung bei einsetzender oder zunehmender klinischer Auffälligkeit. Zudem basiert das Krankheitsbild „Arteriosklerose“ auf einem pathologischen Prozess auf zellulärer Ebene, der bereits Einfluss auf eine Serumanalyse der miRNA-Expression nehmen kann. Folglich kann das zu Überschneidungen bei den Ergebnissen der miRNA-Isolation führen. Es ist davon auszugehen, dass zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses nur selten eine einzige, isolierte arteriosklerotische Erkrankung vorliegt. Das könnte eine mögliche Erklärung sein, warum die Zahl der krankheitsspezifischen miRNAs klein ausgefallen ist. Dieser Punkt muss bei der Betrachtung und der Diskussion der Ergebnisse stets bedacht werden.

In der Literatur finden sich viele miRNA-Studien zum Thema „Arteriosklerose“. Allerdings werden zumeist nur einzelne, spezielle miRNAs auf ihren regulatorischen Einfluss auf zellulärer Ebene untersucht oder aber nur einzelne Erkrankungsbilder untersucht. Mit der Suche nach krankheitsspezifischen miRNA-Expressionsmustern bei gleich mehreren Krankheitsbildern wurde mit dieser Arbeit ein neuer Schritt in der miRNA-Forschung bei Arteriosklerose gewagt. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten den Anlass für weitere Forschung im Bereich der miRNA Diagnostik bei Patienten mit Arteriosklerose geben.

Mit Studieneinschluss erfolgte bei jedem Patienten entweder vor einer geplanten Intervention oder vor einem elektiven operativen Eingriff im Rahmen der stationären oder prästationären Aufnahme eine venöse Blutentnahme. Hier ist es noch einmal wichtig darauf hinzuweisen, dass das Krankheitsstadium der Patienten zum Studienstart nicht unterschieden wurde. Eine Differenzierung anhand der klinischen Ausprägung ist ebenfalls nicht erfolgt. Die Daten für das Krankheitsstadium wurden zwar im Rahmen der Patientenaufnahme mit erhoben, allerdings hätte für eine Analyse der miRNA-Expression in den vereinzelt Krankheitsstadien eine

Unterteilung in viele weitere, deutlich kleineren Subgruppen erfolgen müssen. Für valide Studienergebnisse wäre dementsprechend eine deutlich höhere Patientenzahl erforderlich gewesen. Das hat zur Folge, dass die exprimierten miRNA-Profile im Rahmen dieser Studie unterschiedliche Krankheitsstadien und -ausprägungen beinhalten. Die Untersuchung von miRNA-Expressionsprofile in den unterschiedlichen Stadien der untersuchten Erkrankungsbilder bietet eine gute Basis für weiterführende Untersuchungen.

Die Isolation von Exosomen erfolgte aus den Serumproben der Patienten. Durch die Verwendung von Serumproben besteht das Risiko, dass durch im Blut enthaltene Thrombozyten zusätzliche extrazelluläre Vesikel mit weiteren Mikropartikeln freigesetzt werden und damit das Ergebnis verfälschen könnten. Daher scheint auf den ersten Blick die Verwendung von Blutplasma als die sinnvollere Variante. Allerdings konnten in einer Studie von George et al. erfolgreich nachgewiesen werden, dass nach einer sich der Blutentnahme anschließenden Zentrifugation der frisch entnommenen Serumproben und der Überführung des zentrifugierten Überstands in ein neues Gefäß kein signifikanter Unterschied zwischen Blutserum und Blutplasma im Hinblick auf den Mikropartikelgehalt besteht.<sup>51</sup>

Bei der Zentrifugation des Blutmaterials gilt es zu beachten, dass in Abhängigkeit der Zentrifugationsgeschwindigkeit immer ECVs im Zellpellet enthalten sein könnten. Bei einer Zentrifugation im niedrigen Drehzahlbereich besteht die Möglichkeit, dass große ECVs mit abzentrifugiert werden. Bei höheren Beschleunigungskräften können auch sehr kleine ECVs im Pellet vorhanden sein. Üblicherweise wird in ähnlichen Studien eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 10.000 – 20.000xG verwendet.<sup>52</sup> Deswegen haben auch wir für die ECV-Isolation eine entsprechende Geräteeinstellung gewählt. Diese entsprechen im Übrigen auch den Empfehlungen des Kit-Herstellers.

Die anschließende Lagerung bis zur Weiterverarbeitung der zentrifugierten Serumproben im Labor erfolgte in einem Gefrierschrank bei etwa -80°C. Es ist bekannt, dass bei einer Lagerung des PAXgene® Blood RNA Systems bei Temperaturen unter -20°C eine Aufbewahrung über einen Zeitraum von bis zu acht Jahren problemlos möglich ist. Es handelt sich dabei um eine bereits erfolgreich etablierte Arbeitsmethode. <sup>46,47</sup>

Die Serumproben wurden in vier einzelnen Sequenzierungsdurchläufen untersucht. Dabei wurde – sofern möglich – auf eine gleiche Verteilung der Sub- und Kontrollgruppen über die vier Läufe geachtet mit dem Ziel einen Batch-Effekt zu vermeiden. <sup>53</sup> Zur Filterung der Exosomen aus den extrahierten ECVs wurde mit dem „miRCURY™ Exosome Isolation Kit“ gearbeitet. Das Kit verwendet die Methode der Polymerpräzipitation. Es handelt sich dabei um ein einfach umsetzbares, zeitsparendes Verfahren von hoher Effektivität. <sup>52,54</sup>.

Für eine quantitative und qualitative Untersuchung der isolierten Proteine stehen optische und nicht-optische Verfahren zur Verfügung. Die Elektronenmikroskopie ist ein wissenschaftlich etabliertes optisches Verfahren. In unserer Studie wurde die Transmissionselektromikroskopie eingesetzt (TEM). Dabei ist es möglich Proteine mit Hilfe von Elektronenstrahlen mit einer Auflösung bis zu 0.045nm darzustellen. Bei biologischen Materialien liegt die Beschleunigungsspannung dabei im Bereich von 80-120kV. <sup>55</sup> Anhand der Größe der beobachteten Vesikel wurde vermutet, dass die Isolation der Exosomen mit Hilfe des verwendeten Kits erfolgreich war. <sup>33,37</sup> Zur Bestätigung dieser Annahme wurde zusätzlich ein Western Blot durchgeführt. Zum Nachweis der Existenz wurden Standardmarker verwendet, die bereits in vielen anderen Studien erfolgreich zur Anwendung kamen (CD63, CD81 und TSG101). Bedenken sollte man jedoch, dass im Rahmen eines Western Blots lediglich der Nachweis möglich ist, dass es sich um Proteine handelt. Über die Herkunft, also aus Exosomen, anderen Vesikeln oder aus Verunreinigungen kann in diesem Verfahren keine Aussage getroffen werden. Daher ist die Anwendung lediglich in Kombination mit anderen – in diesem Fall einem optischen Verfahren sinnvoll. <sup>52</sup>

## 10.2 Diskussion der anamnestischen Parameter

Zur Durchführung dieser Studie wurden insgesamt 134 Patienten mit einer arteriosklerotischen Erkrankung rekrutiert. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe mit 32 gesunden Probanden als Vergleichsgruppe herangezogen. Betrachtet man die Geschlechterverteilung unter den 134 Arteriosklerosepatienten fällt auf, dass es sich bei 99 der 134 Patienten um Männer handelt. Das männliche Geschlecht gilt als ein klassischer Risikofaktor für die Ausbildung von Arteriosklerose.<sup>6</sup> Das zeigen auch diverse Arbeiten und Publikationen mit Bezug auf das Erkrankungsbild der Arteriosklerose.<sup>27</sup> In Bezug auf das Patientenalter lässt sich festhalten, dass der Altersmittelwert aller Patienten mit einer arteriosklerotischen Erkrankung bei knapp über 70 Jahren liegt. Bei drei der vier untersuchten Erkrankungsbildern liegt der Altersmittelwert auf einem ähnlichen Niveau:

- BAA: 71Jahre
- pAVK: 70 Jahre
- KHK: 69 Jahre

Der Altersmittelwert in der Patientengruppe „Karotisstenose“ liegt bei 73 Jahren. Es ist bekannt, dass sich Arteriosklerose vor allem mit steigendem Lebensalter manifestiert. Das zeigte auch eine Umfrage mit mehr als 3 Millionen Teilnehmern in den USA.

Im Rahmen des Anamnesegesprächs wurde zudem das Vorliegen eines bekannten Bluthochdrucks erfragt. Das Ergebnis zeigt: Bei etwas mehr als 75% aller Patienten lag zum Aufnahmezeitpunkt eine arterielle Hypertonie vor. Der Anteil an Hypertoniepatienten zeigte sich dabei in allen vier untersuchten Erkrankungsgruppen gleich. Das Körpergewicht der Patienten wurde im Rahmen unserer Studie in Relation zur Körpergröße beurteilt. Dafür wurde für jeden Probanden der BMI errechnet. Der BMI-Mittelwert aller Patienten lag bei 27.89. Die größten BMI-Werte zeigten sich in den beiden Patientengruppen mit einer pAVK (29.45) und einer KHK (29.50). Der Zusammenhang von Adipositas und arteriosklerotischen Erkrankungen

ist seit mehr als 50 Jahren bekannt.<sup>56</sup> Weitere erfragte Risikofaktoren bei Studienaufnahme waren ein vorliegender, typenunabhängiger Diabetes mellitus und ein bestehender oder aber stattgehabter Nikotinabusus. In beiden Fällen war der größte Patientenanteil ebenfalls in der pAVK- und in der KHK-Patientengruppe zu finden (siehe Abbildungen 7 – 10). Durch eine Analyse der anamnestisch erhobenen Risikofaktoren wird deutlich, dass in unserer Patientengruppe Risikofaktoren gehäuft als gebündeltes Cluster vorliegen. Etwa 65% aller Probanden hatten zum Einschlusszeitpunkt mindestens 3 oder mehr Risikofaktoren (Abbildung 11). Das zeitgleiche Auftreten mehrerer bekannter Risikoprofile für Arteriosklerose erhöht die Häufigkeit, wie auch das Spektrum von kardiovaskulären Erkrankungen.<sup>57</sup> Bluthochdruck, Diabetes und Rauchen gelten vor allem für die koronare Herzerkrankung als starke Risikofaktoren – insbesondere bei einem Auftreten der Risikofaktoren als gemeinsamer Cluster.<sup>58</sup> Ferrannini und Cushman haben gezeigt, dass bei bekanntem Typ-2-Diabetes die Prävalenz einer arteriellen Hypertonie bei etwa 70% liegt.<sup>59</sup> Eine in Pittsburgh durchgeführte Studie zur Epidemiologie von Diabetes hat gezeigt, dass das gemeinsame Auftreten von einem Diabetes mellitus und einer arteriellen Hypertonie zu einer deutlich höheren Morbidität und Mortalität bei einer arteriellen Verschlusskrankheit der unteren Extremität führt.<sup>60</sup> Das zeitgleiche Vorliegen einer Hypertonie, einer gestörten Glucosetoleranz (bzw. Diabetes mellitus), einer abdominellen Fettleibigkeit / zentralen Adipositas und steigendem BMI, sowie einer Fettstoffwechselstörung bezeichnet man auch als metabolisches Syndrom. Dabei handelt es sich um ein sehr aktuelles und beliebtes Thema im Bereich der Untersuchung bei der Ätiologie von kardiovaskulären Erkrankungen. Das Zusammenspiel dieser Komorbiditäten stellt einen pathologischen Zustand dar, der das Risiko für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen deutlich erhöht.<sup>57</sup> Doch trotz zahlreicher Forschungen ist es bis heute weiterhin unklar, wie das gleichzeitige Zusammenwirken das Auftreten und Fortschreiten von arteriosklerotischen Erkrankungen fördert.<sup>57</sup>

### 10.3 Diskussion der miRNA-Expressionsprofile

Der Vergleich der miRNA-Expressionsprofile zwischen der Arteriosklerosegruppe und der Kontrollgruppe ergab zunächst 114 unterschiedlich exprimierte miRNAs. Die Anwendung von im Vorfeld definierten Filterkriterien ( $\log_2FC \geq 1$ , angepasster p-Wert  $\leq 0,1$  und Basismittelwert  $\geq 50$ ) konnten 27 verschiedenen miRNAs standhalten (Tabelle 12).

miRNAs Arteriosklerose vs. Kontrollgruppe	Gefunden in den Subgruppen
<b>hsa-miR-122-5p</b>	BAA
<b>hsa-miR-193a-5p</b>	BAA; KHK; KS; pAVK
<b>hsa-miR-199a-5p</b>	pAVK
<b>hsa-miR-2110</b>	BAA
<b>hsa-miR-215-5p</b>	pAVK
<b>hsa-miR-27a-5p</b>	BAA
<b>hsa-miR-3168</b>	pAVK
hsa-miR-320a-3p	BAA; KHK; pAVK
hsa-miR-320b	BAA; KHK; pAVK
hsa-miR-320c	BAA; pAVK
<b>hsa-miR-320d</b>	BAA; KHK; KS; pAVK
<b>hsa-miR-335-3p</b>	KS
<b>hsa-miR-370-3p</b>	KHK
hsa-miR-378d	BAA; KHK
<b>hsa-miR-381-3p</b>	KS
<b>hsa-miR-409-3p</b>	KHK
hsa-miR-4433b-3p	BAA; pAVK
<b>hsa-miR-483-5p</b>	BAA
hsa-miR-493-3p	KHK; KS
<b>hsa-miR-493-5p</b>	KS
hsa-miR-495-3p	KHK; KS
hsa-miR-543	BAA; KHK; KS
hsa-miR-576-3p	BAA; pAVK
<b>hsa-miR-582-3p</b>	pAVK
hsa-miR-629-5p	BAA; pAVK
<b>hsa-miR-654-3p</b>	KS
<b>hsa-miR-769-5p</b>	pAVK

**Tabelle 12** - Unterschiedlich exprimierte miRNAs zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nach Anwendung der oben genannten Filterkriterien. Hervorgehoben sind die miRNAs, die entweder in vier Subgruppen oder nur in einer einzelnen Gruppe nachgewiesen werden konnten.

Diese Ergebnisse wurden im Anschluss noch ein zweites Mal gefiltert ( $\log_2FC \geq |1|$ , adjustierter p-Wert (Benjamini & Hochberg)  $\leq 0,1$  und Basismittelwert  $\geq 50$ ). 16 miRNAs hielten dieser letzten Filterung stand und konnten im Rahmen einer Überlappungsanalyse den einzelnen Krankheitsbildern zugeordnet werden (siehe Tabelle 12 – **fettgedruckt** -). Lediglich die **miR-193a-5p** und die **miR-320d** zeigten in allen vier untersuchten Erkrankungsgruppen eine signifikant veränderte Expression gegenüber der Kontrollgruppe. Zudem konnten unter den genannten Filterkriterien einige gruppenspezifische miRNAs detektiert werden: Die miRNAs hsa-miR-122-5p, hsa-miR-2110, hsa-miR-27a-5p und hsa-miR-483-5p für die BAA-Gruppe. Die miRNAs hsa-miR-335-3p, hsa-miR-381-3p, hsa-miR-493-5p und hsa-miR-654-3p für die KS-Gruppe. Die miRNAs hsa-miR-370-3p und hsa-miR-409-3p für die KHK-Gruppe und die miRNAs hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-3168, hsa-miR-582-3p und hsa-miR-769-5p für die pAVK-Gruppe. Es hat sich gezeigt, dass einige der identifizierten miRNAs bereits in anderen Studien mit arteriosklerotischen Prozessen in Verbindung gebracht werden konnten. Das untermauert die Relevanz der Ergebnisse.

Unsere Analyse ergab, dass die **miR-381-3p** beim Vergleich mit der Kontrollgruppe herunterreguliert war ( $p = 0.036$ ). Die miR-381-3p wurde in der Studie als spezifischer Marker in der Karotisstenose-Gruppe gefunden. Im Rahmen einer Zellkulturstudie mit glatten, vaskulären Muskelzellen konnte diese miRNA mit diversen arteriosklerotischen Prozessen in Verbindung gebracht werden – allen voran mit oxidativem Stress und mit der Migration von Immunzellen. Zhu und Kollegen gelang dabei der Nachweis, dass die miR-381-3p Prozessabläufe im Rahmen der Entzündungsreaktion, sowie die Proliferation und Migration von Immunzellen erfolgreich unterdrückt.<sup>61</sup> Dabei handelt sich um zwei wichtige Prozesse für die Entstehung von Arteriosklerose. Die **miR-27a-5p** wurde ebenfalls bereits mit arteriosklerotischen Prozessen verknüpft. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die miR-27a-5p entscheidende Rollen im Fettstoffwechsel, bei oxidativem Stress und bei Insulinresistenz spielt.<sup>62</sup>

Interessant ist auch das Ergebnis für die miRNA **hsa-miR-2110**. Sie wurde im Rahmen dieser Studie als spezifische miRNA bei der Bauchortenaneurysma-Patientengruppe detektiert, und war im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe vermehrt exprimiert ( $p = 0.007$ ). Die miR-2110 konnte in einer anderen Arbeit bereits mit Arteriosklerose und einem Bauchortenaneurysma in Verbindung gebracht. Azuma und Kollegen und die Arbeitsgruppe um Anja Hofmann haben herausgefunden, dass die die miR-2110 einen regulatorischen Einfluss hat auf die Expressierung des zytoprotektiven Enzyms Häm-Oxygenase-1 hat. Dieses Enzym wird durch erhöhte Fluss- und Entzündungsreize am Gefäßsystem hochreguliert. Zusätzlich wurde herausgefunden, dass eine verminderte HO-1-Expression die Entwicklung von abdominellen Aortenaneurysmen fördert.<sup>63,64</sup>

Für die miRNA **hsa-miR-378d** konnten im Rahmen der Sequenzierung spezifische Expressionsmuster in der BAA- und der KHK-Patientengruppe festgestellt werden. In einer Arbeit von Weber und Kollegen wurde für die miR-378d eine veränderte Expression bei einem Vergleich von Patienten mit angiografisch signifikanter KHK und einer Kontrollgruppe nachgewiesen. Außerdem hat die Arbeitsgruppe festgestellt, dass die Expression der miR-378d durch eine medikamentöse Therapie beeinflussbar zu sein scheint.<sup>65</sup> Viele unserer Studienteilnehmer waren bereits durch ihr Vorerkrankungsprofil medikamentös eingestellt. Dabei handelte es sich häufig um klassische Medikationsprofile im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen: Antihypertensiva verschiedener Klassen, Diuretika, Antiarrhythmika verschiedener Klassen und Antidiabetika sowie Insuline. Der Einfluss der medikamentösen Therapie auf die miRNA-Expression, in diesem Fall speziell für die miR-378d bietet einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

Mit der **hsa-miR-370-3p** ( $p = 0.007$ ) und der **hsa-miR-409-3p** ( $p = 0.006$ ) haben wir zwei spezifische miRNAs in der KHK-Patientengruppe gefunden. Beide miRNAs waren beim Vergleich mit der Kontrollgruppe geringer exprimiert. Und beide miRNAs sind in anderen Forschungsgruppen sowohl mit Arteriosklerose als auch mit der koronaren Herzerkrankung in

Verbindung gebracht worden. So wurde in einer Arbeit von Gao Jie und Kollegen die miR-370-3p mit einer KHK in Verbindung gebracht. Als Regulator nimmt diese miRNA Einfluss auf die Translation des Proteins Apelin. Ein Zusammenhang von veränderten Apelinspiegeln bei einem Vergleich zwischen KHK-Patienten und gesunden Patienten konnte ebenfalls nachgewiesen werden.<sup>66</sup> Außerdem haben Namazi und Kollegen eine Korrelation von erhöhten Apelinspiegeln im Serum von KHK-Patienten und der Ausprägung der Koronarstenosen herstellen können.<sup>67</sup>

Die **miR-199a-5p** ist im Rahmen dieser Studie als pAVK-assoziierte miRNA in Erscheinung getreten. Eine experimentelle Arbeit von Zhang und Kollegen zeigt, dass makrophagen-abgeleitete extrazelluläre Vesikel die miR-199a-5p enthalten und gezielt auf Endothelzellen wirken. Dort moduliert die microRNA proinflammatorische Signalwege und damit an der Pyroptose von Endothelzellen maßgeblich beteiligt.<sup>68</sup>

Im Rahmen dieser Studie konnten beim Vergleich zwischen Patienten mit einer arteriosklerosebedingten Erkrankung und der gesunden Kontrollgruppe sowohl die **miR-193a-5p** als auch die **miR-320d** im Serum signifikant erhöht nachgewiesen werden. Diese Hochregulation zeigte sich über aller vier Manifestationsformen der Arteriosklerose hinweg. Diese Richtungsstabilität legt nahe, dass es sich bei den beiden miRNAs um einen systemischen Marker für das arteriosklerotische Erkrankungsbild handelt. Diese Annahme lässt sich auch mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten in den Kontext setzen.

So hat eine erst kürzlich publizierte Studie zur Identifikation von miRNA-Biomarkern in extrazellulären Vesikeln und in gewonnenem Plaquematerial bei Patienten mit symptomatischer Karotisstenose gezeigt, dass die miR-193a-5p nicht nur in Serumproben, sondern auch in Plaquematerial signifikant erhöhte Expressionsmuster zeigt. Das legt eine Verbindung zwischen lokaler Plaquebiologie und systemischer miRNA-Signatur nahe. Eine durchgeführte Zielgen-Analyse dieser microRNA zeigte einen bestehenden Einfluss der miR-193a-5p auf inflammatorische und vaskuläre Signalwege, die für die Plaque-Entstehung und -

Progression von zentraler Bedeutung sind.<sup>69</sup> In einer groß angelegten populationellen Analyse wird gezeigt, dass die miR-193a-5p gemeinsam mit anderen miRNAs im Plasma mit klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert ist, vorwiegend mit einem erhöhten Nüchternblutzucker.<sup>70</sup> Diese Assoziation ist auch in dieser Studie erkennbar bei der Untersuchung der miR-193a-5p und den kardiovaskulären Risikofaktoren, allerdings nur bei einem erhöhten BMI (BMI > 30; p = 0.058), bei einem bestehenden Diabetes p = 0.082) und bei dem zeitgleichen Auftreten von drei oder mehr Risikofaktoren (RF > 3; p = 0.059). Eine statistische Signifikanz konnte hier allerdings nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus gibt es Arbeiten, die wiederum die funktionelle Rolle der miR-193a-5p untersucht haben. So ist es Karlin und Kollegen der Nachweis gelungen in nephrologischen Modellen nachzuweisen, dass die miR-193a-5p die Differenzierung von Podozyten moduliert und damit effektiv Einfluss nehmen können auf die Zellproliferation, die auch bei der Entstehung der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielen.<sup>70</sup> Obwohl dieses Modell sich auf das renale System bezieht, so sind die beschriebenen Mechanismen auch für vaskuläre glatte Muskelzellen und Endothelzellen relevant. Diese Befunde stützen die Annahme, dass die miR-193a-5p als regulatorische miRNA an grundlegenden Prozessen beteiligt ist, die auch in der Pathogenese der Arteriosklerose eine zentrale Rolle spielt.

Polini und Kollegen ist es gelungen der miR-193a-Familie eine relevante Rolle durch Einflüsse auf mTOR-Signalwege bei der Tumorsuppression bei Hautkrebs zuzuordnen. Dabei handelt es sich um eine Proteinkinase mit dem Namen mTOR (mechanistic target of rapamycin). Sie besitzt unterschiedliche Aufgabe in der Proteinsynthese, der Zellteilung und der Zellproliferation – allesamt Prozesse, die auch für die Pathogenese der Arteriosklerose von Bedeutung sind.<sup>71</sup>

Auch die miR-320d zeigte in der Expressionsanalyse eine gruppenübergreifend verstärkte Expression, die in der Ausprägung jedoch geringer ist als bei der miR-193a-5p ausfällt. Die funktionelle Evidenz für eine direkte Spezifität als ein Marker für ein arteriosklerotisches

Erkrankungsbild für diese miRNA ist bislang begrenzt. Vielmehr wird im Rahmen der aktuellen Literatur die miR-320d als systemischer, vaskulärer und kardiometabolischer Modulator eingeordnet. In einer Übersichtsarbeit zur Rolle der miR-320-Familie bei Arteriosklerose wird beschrieben, dass sie Prozesse wie Cholesterin-Efflux, Makrophagenaktivierung und endothelialer Funktion beeinflussen. Dabei handelt es sich um Prozesse, die für die Entstehung und Progression arteriosklerotischer Erkrankungen relevant sind.<sup>72</sup> Die **miR-320-b** wurde im Rahmen der miRNA-Expressionsanalyse in den Patientengruppen BAA, KHK und pAVK gefunden. In jeder dieser drei Gruppen war die miR-320-b beim Vergleich mit der Kontrollgruppe vermehrt exprimiert ( $p(\text{BAA}) = 0.000294$ ;  $p(\text{KHK}) = 0.035$ ;  $p(\text{pAVK}) = 0.00435$ ). Zhang und Kollegen haben die miR-320-b bereits als potenziellen Biomarker für zerebrovaskuläre Erkrankungen im Rahmen eines Schlaganfalls, sowie als Biomarker für Karotisstenosen assoziiert.<sup>73</sup> In dieser Studie konnte in der Gruppe der Patienten mit einer Karotisstenose die miR-320-b keine signifikante Veränderung gefunden werden. Ein möglicher Grund dafür könnte die strengen Filterkriterien darstellen. Auch der Arbeitsgruppe um Talevi und Kollegen ist es gelungen die miR-320-Familie mit der Modulation von Gefäßfunktionen bei zerebrovaskulären Schädigungen in Verbindung zu bringen.<sup>74</sup>

Vor diesem Hintergrund erscheint die in dieser Arbeit nachgewiesene Hochregulation der miR-320d konsistent mit der Annahme, dass arteriosklerotische Erkrankungen nicht lokal begrenzte Prozesse darstellen, sondern Ausdruck einer generalisierten vaskulären Pathologie sind.

## 10.4 Kritische Hinterfragung des Studiendesigns

Viele der identifizierten miRNAs weisen niedrige differentielle Expressionswerte beim Vergleich der Patientengruppen mit der Kontrollgruppe auf. Hier wäre für eine Validierung der Ergebnisse die Untersuchung von Serumproben einer zweiten Patientengruppe erforderlich und sinnvoll gewesen, da ein zweiter Datensatz aus einer sekundären, unabhängigen Patientenkohorte eine genauere und bessere Analyse verspricht. Eine Ausweitung unserer Untersuchungen war jedoch aufgrund fehlender finanzieller Mittel nicht möglich. Des Weiteren fehlt eine Differenzierung der miRNA-Expressionsmuster in Bezug auf das vorliegende Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Studienaufnahme. Die Krankheitsstadien wurden zwar erfasst und protokolliert. Eine Untersuchung in jeder der vier untersuchten Erkrankungsgruppen hätte allerdings eine Unterteilung in viele weitere kleine Subgruppen zur Folge gehabt. Für valide Ergebnisse hätte es eine deutliche höheren Patientenzahl benötigt. Hier ergibt sich ein guter Ansatz für weiterführende Studien für miRNA-Expressionsmuster bei arteriosklerotisch bedingten Erkrankungen. Das heißt: folgende Studien sollten eine Differenzierung unterschiedlicher Krankheitsstadien (pAVK-Stadien, Stenosierungsgrad der Carotiden, Umfang des bestehenden Bauchortenaneurysma, Stenosierungsgrad der Herzkranzgefäße) in Betracht ziehen und zum anderen auf funktionelle Analysen der hier detektierten miRNAs abzielen.

Für die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten miRNA-Extraktionssysteme liegen weder herstellerseitige Validierungsdaten vor, noch existieren Literaturangaben zur analytischen Varianz vor. Die verwendeten PAXgene Blood RNA-Systeme sind für die Stabilisierung zellulärer RNA im Vollblut validiert und zeichnen sich laut Herstellerangaben durch ein hohe intra- und inter-assay-Reproduzierbarkeit aus. Es wird darauf verwiesen, dass die verbleibende analytische Varianz maßgeblich durch präanalytische Faktoren wie Lagerung, Verarbeitung und Zellzusammensetzung des Blutes beeinflusst wird. Dasselbe gilt für das miCURY Exosome Serum/Plasma Kit von Qiagen und das NucleoSpin miRNA Kit von Macherey-Nagel. Auch wird

angegeben, dass bei Serum-/Plasmaanalysen von miRNAs und ECVs ein relevanter Anteil der Varianz nicht die Laborarbeiten selbst, sondern auf die Extraktionsmethode zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Studie auf eine streng standardisierte Präanalytik geachtet, von der Blutentnahme, über die Probenverarbeitung und -lagerung bis hin zur letztendlichen Analyse der Proben. Bezüglich der durchgeführten Mittelwertanalysen bleibt festzuhalten, dass diese im Rahmen dieser Studie lediglich als unterstützende deskriptive Einordnung zu sehen sind und die Ergebnisse der Expressionsanalyse klar im Vordergrund stehen, auch wenn die Richtung der Mittelwertanalysen den Ergebnissen der differentiellen Expressionsanalyse entspricht.

Die Studie war als hypothesengenerierend ausgelegt mit dem Ziel, potenzielle Biomarker für verschiedene vaskuläre Manifestationen der systemischen Arteriosklerose zu identifizieren und gefundene miRNA-Cluster mit dem arteriosklerotischen Risikoprofil der Patienten zu vergleichen. Für ein vollständiges Biomarker-Panel für Arteriosklerose und arteriosklerotische Erkrankungen müssen weitere Studien durchgeführt werden. Jede miRNA kann eine große Anzahl von mRNA-Transkripten regulieren. Daher kann schon der kleinste Unterschied in der Expression einer einzelnen miRNA eine enorme Veränderung auf zellulärer Ebene und große biologische Konsequenzen nach sich ziehen. Es ist davon auszugehen, dass einige der identifizierten miRNAs tatsächlich für das Screening von Patienten mit klinisch vermuteter arteriosklerotischer Erkrankung nützlich sein können.

## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den lieben Menschen bedanken, die mich über die Zeit des Studiums und während der Erstellung meiner Doktorarbeit begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Bedanken möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Gustav Schelling und PD Dr. Ines Kaufmann für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, sowie die freundliche Unterstützung und die zahlreichen und wertvollen Ratschläge.

Ganz besonders bedanken möchte ich Herrn Dr. Billurvan Taskin und Herrn PD Dr. Rolf Weidenhagen aus der gefäßchirurgischen Abteilung des Klinikums Neuperlach der München Kliniken, sowie dem gesamten Personal der gefäßchirurgischen Stationen und des Labors, die mich bei der Patientenrekrutierung und der Probengewinnung tatkräftig unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gebührt zudem Herrn Dr. Florian Brandes, der es mir ermöglicht hat, die Patientenrekrutierung durchzuführen und mir als Betreuer mit seinen Ratschlägen stets den richtigen Weg gewiesen hat. Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Benedikt Kirchner und Herr M. Sc. Alex Hildebrand vom Lehrstuhl für Tierphysiologie und Immunologie der Technischen Universität München bedanken, die mir die Expressionsdaten der microRNA-Analyse zur Verfügung gestellt haben.

Zudem möchte ich mich bei meiner Frau - Carmen Doege geb. Fuchs - für ihre unermüdliche Motivation und ihrer uneingeschränkten Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Großer Dank gebührt ebenfalls meinen Eltern für die viele Geduld und den großen Rückhalt schon während des Medizinstudiums und bei der Erstellung dieser Dissertation.

## 12. Eidesstattliche Versicherung



### Eidesstattliche Versicherung

Doege, Alexander

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Vergleich von microRNA-Expressionsprofilen aus Blut- und Serumproben und dem arteriosklerotischen Risikoprofil bei Patienten mit arteriosklerotisch bedingten Erkrankungsbildern**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Zettel, 13.02.2026

Ort, Datum

Alexander Doege

Unterschrift Alexander Doege

## 14. Erklärung zur Übereinstimmung



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



### Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Doege, Alexander

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Vergleich von microRNA-Expressionsprofilen aus Blut- und Serumproben und dem  
arteriosklerotischen Risikoprofil bei Patienten mit arteriosklerotisch bedingten  
Erkrankungsbildern**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Zettel, 13.02.2026

Ort, Datum

Alexander Doege

Unterschrift Alexander Doege

## 15. References

1. Dihlmann S, Peters AS, Hakimi M. Entstehung der Arteriosklerose [Development of arteriosclerosis]. *Pathologie* 2019;40:559–72.
2. Rocha-Singh KJ, Zeller T, Jaff MR. Peripheral arterial calcification: prevalence, mechanism, detection, and clinical implications. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2014;83:E212-20. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24402839/>).
3. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins basic pathology. Philadelphia: Elsevier, 2018.
4. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 9th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders, 2015.
5. The top 10 causes of death, 2021. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>).
6. Assmann G, Schulte H. The Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *American heart journal* 1988;116. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3202078/>).
7. Borgman M, McErlean E. What is the metabolic syndrome? Prediabetes and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Nurs* 2006;21:285–90.
8. A visualized overview of global and regional trends in the leading causes of death and disability 2000-2019, 2021. (<https://www.who.int/data/stories/leading-causes-of-death-and-disability-2000-2019-a-visual-summary>).
9. E.S. Debus<sup>1</sup> · G. Torsello<sup>2</sup> · T. Schmitz-Rixen<sup>3</sup> · T. Hupp<sup>4</sup> · W. Lang<sup>5</sup> · T. Noppeney<sup>6</sup> · A. Oberhuber<sup>7</sup> · R.T. Grundmann<sup>8</sup>. Manifestationen und Prävention der Arteriosklerose. *Gefäßchirurgie* 2013;2013.

10. Atherosklerose, fibroatheromatöser Plaque | el-IPH · Kurs Allgemeinpathologie, 2021. (<https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/allg/54/atherosklerose-fibroatheromatoeser-plaque>).
11. Dietz R, Rauch B. Leitlinie zur Diagnose und Behandlung der chronischen koronaren Herzerkrankung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung (DGK). Z Kardiol 2003;92:501–21.
12. Lawall H, Diehm C, Hoffmann U, Reinecke H. Periphere arterielle Verschlusskrankheit: Epidemiologie, Komorbidität und Prognose [Update PAVK: Epidemiology, comorbidity and prognosis of peripheral arterial obstructive disease]. Dtsch Med Wochenschr 2015;140:1798–802.
13. Landesärztekammer B. S3-Leitlinie Extrakranielle Karotisstenose. Multidisziplinäre, evidenz- und konsensbasierte deutsch-österreichische Leitlinie, 2023. (<https://www.bayerisches-aerzteblatt.de/inhalte/details/news/detail/News/s3-leitlinie-extrakranielle-karotisstenose-multidisziplinaere-evidenz-und-konsensbasierte-deutsch.html>).
14. Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, et al. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery 2011;41 Suppl 1:S1-S58. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/21215940/>).
15. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 1993;362:801–9. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/8479518/>).

- 16.** Godo S, Shimokawa H. Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:e108-e114. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/28835487/>).
- 17.** Atherosklerose und kardiovaskuläre Prävention - Wissen @ AMBOSS, 2023. ([https://www.amboss.com/de/wissen/Atherosklerose\\_und\\_kardiovaskul%C3%A4re\\_Pr%C3%A4vention/](https://www.amboss.com/de/wissen/Atherosklerose_und_kardiovaskul%C3%A4re_Pr%C3%A4vention/)).
- 18.** Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685–95. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/15843671/>).
- 19.** Herold G. Innere Medizin 2021. De Gruyter, 2021.
- 20.** Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin, Deutsche Gesellschaft Ernährungsmedizin, et al. Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK - Langfassung, 5. Auflage. Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2019.
- 21.** Knuuti J, Wijns W, Saraste A, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J* 2020;41:407–77. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/31504439/>).
- 22.** Kolominsky-Rabas PL, Weber M, Gefeller O, Neundoerfer B, Heuschmann PU. Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke* 2001;32:2735–40. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/11739965/>).

23. Grau AJ, Weimar C, Buggle F, et al. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke* 2001;32:2559–66. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.uni-muenchen.de/11692017/>).
24. Weerd M de, Greving JP, Jong AWF de, Buskens E, Bots ML. Prevalence of asymptomatic carotid artery stenosis according to age and sex: systematic review and meta-regression analysis. *Stroke* 2009;40:1105–13. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.uni-muenchen.de/19246704/>).
25. Weerd M de, Greving JP, Hedblad B, et al. Prevalence of asymptomatic carotid artery stenosis in the general population: an individual participant data meta-analysis. *Stroke* 2010;41:1294–7.
26. Greiner A, Grommes J, Jacobs MJ. The place of endovascular treatment in abdominal aortic aneurysm. *Dtsch Arztebl Int* 2013;110:119–25.
27. E.S. Debus FH. S3-Leitlinie zu Screening, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Bauchortenaneurysmas. AWMF online 2018.
28. Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Powell JT. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *The British journal of surgery* 2012;99:655–65. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.uni-muenchen.de/22389113/>).
29. Chaikof EL, Brewster DC, Dalman RL, et al. The care of patients with an abdominal aortic aneurysm: the Society for Vascular Surgery practice guidelines. *Journal of vascular surgery* 2009;50:S2-49. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.uni-muenchen.de/19786250/>).
30. Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL. *Stryer Biochemie*. 7th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.

- 31.** Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 2015;87:3–14. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/25979468/>).
- 32.** Churov A, Summerhill V, Grechko A, Orekhova V, Orekhov A. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 2019;20. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/31703274/>).
- 33.** Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Molecular and cellular pharmacology* 2011;3:83–92. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/22468167/>).
- 34.** Shu Z, Tan J, Miao Y, Zhang Q. The role of microvesicles containing microRNAs in vascular endothelial dysfunction. *Journal of cellular and molecular medicine* 2019;23:7933–45. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/31576661/>).
- 35.** O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:402. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/30123182/>).
- 36.** Yamazawa R, Jiko C, Choi S, et al. Structural Basis for Selective Binding of Export Cargoes by Exportin-5. *Structure* 2018;26:1393-1398.e2. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/30100359/>).
- 37.** Zhao S, Liu M-F. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation. *Sci China C Life Sci* 2009;52:1111–6. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/20016967/>).
- 38.** McManus DD, Ambros V. Circulating MicroRNAs in cardiovascular disease. *Circulation* 2011;124:1908–10. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/22042926/>).

39. Pereira-da-Silva T, Coutinho Cruz M, Carrusca C, Cruz Ferreira R, Napoleão P, Mota Carmo M. Circulating microRNA profiles in different arterial territories of stable atherosclerotic disease: a systematic review. *Am J Cardiovasc Dis* 2018;8:1–13.
40. Böttger T. mikroRNAs regulieren essenzielle Funktionen im kardiovaskulären System. Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V, 2016.
41. Leeper NJ, Maegdefessel L. Non-coding RNAs: key regulators of smooth muscle cell fate in vascular disease. *Cardiovasc Res* 2018;114:611–21. (<https://academic.oup.com/cardiovascres/article/114/4/611/4781705>).
42. Yang F, Chen Q, He S, et al. miR-22 Is a Novel Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Modulation and Neointima Formation. *Circulation* 2018;137:1824–41.
43. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2045–51.
44. Fan X, Wang E, Wang X, Cong X, Chen X. MicroRNA-21 is a unique signature associated with coronary plaque instability in humans by regulating matrix metalloproteinase-9 via reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs. *Experimental and Molecular Pathology* 2014;96:242–9. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014480014000240>).
45. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie C. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *Journal of Chronic Diseases* 1987;40:373–83. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021968187901718>).
46. Reithmair M, Buschmann D, Märte M, et al. Cellular and extracellular miRNAs are blood-compartment-specific diagnostic targets in sepsis. *Journal of cellular and molecular medicine* 2017;21:2403–11. (<https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/28382754/>).

47. Hildebrandt A, Kirchner B, Meidert AS, et al. Detection of Atherosclerosis by Small RNA-Sequencing Analysis of Extracellular Vesicle Enriched Serum Samples. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:729061.
48. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001;98:5116–21.
49. Fichtlscherer S, Rosa S de, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2010;107:677–84.
50. Xiong X, Cho M, Cai X, et al. A common variant in pre-miR-146 is associated with coronary artery disease risk and its mature miRNA expression. *Mutat Res* 2014;761:15–20.
51. George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* 1982;60:834–40.
52. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2013;2.
53. Leek JT, Scharpf RB, Bravo HC, et al. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nat Rev Genet* 2010;11:733–9.
54. Abramowicz A, Widlak P, Pietrowska M. Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation. *Mol Biosyst* 2016;12:1407–19.
55. Sawada H, Shimura N, Hosokawa F, Shibata N, Ikuhara Y. Resolving 45-pm-separated Si-Si atomic columns with an aberration-corrected STEM. *Microscopy (Oxf)* 2015;64:213–7.
56. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;67:968–77.
57. Tune JD, Goodwill AG, Sassoon DJ, Mather KJ. Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Transl Res* 2017;183:57–70.

58. Savji N, Rockman CB, Skolnick AH, et al. Association between advanced age and vascular disease in different arterial territories: a population database of over 3.6 million subjects. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;61:1736–43. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/emedien.ub.uni-muenchen.de/23500290/>).
59. Ferrannini E, Cushman WC. Diabetes and hypertension: the bad companions. *Lancet* 2012;380:601–10.
60. Forrest KY, Becker DJ, Kuller LH, Wolfson SK, Orchard TJ. Are predictors of coronary heart disease and lower-extremity arterial disease in type 1 diabetes the same? A prospective study. *Atherosclerosis* 2000;148:159–69.
61. Zhu X-S, Zhou H-Y, Yang F, Zhang H-S, Ma K-Z. miR-381-3p inhibits high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration by targeting HMGB1. *J Gene Med* 2021;23:e3274.
62. Chen W-J, Yin K, Zhao G-J, Fu Y-C, Tang C-K. The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012;222:314–23.
63. Hofmann A, Möglich M, Wolk S, et al. Induction of Heme Oxygenase-1 Is Linked to the Severity of Disease in Human Abdominal Aortic Aneurysm. *J Am Heart Assoc* 2021;10:e022747.
64. Azuma J, Wong RJ, Morisawa T, et al. Heme Oxygenase-1 Expression Affects Murine Abdominal Aortic Aneurysm Progression. *PLoS One* 2016;11:e0149288.
65. Weber M, Baker MB, Patel RS, Quyyumi AA, Bao G, Searles CD. MicroRNA Expression Profile in CAD Patients and the Impact of ACEI/ARB. *Cardiol Res Pract* 2011;2011:532915.
66. Gao J, Liu J, Zhang Y, et al. PBMCs-Derived microRNA Signature as a Prethrombotic Status Discriminator in Stable Coronary Artery Disease. *Thromb Haemost* 2020;120:121–31.

- 67.** Namazi G, Salami R, Pourfarzam M, Asa P, Mafi A, Raygan F. Association of the serum apelin, but not ghrelin, with the presence and severity of coronary artery disease. *Indian Heart J* 2021;73:214–7.
- 68.** Liang W, Chen J, Zheng H, et al. MiR-199a-5p-containing macrophage-derived extracellular vesicles inhibit SMARCA4 and alleviate atherosclerosis by reducing endothelial cell pyroptosis. *Cell biology and toxicology* 2023;39:591–605. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35930100/>).
- 69.** Brandes F, Meidert AS, Kirchner B, et al. Identification of microRNA biomarkers simultaneously expressed in circulating extracellular vesicles and atherosclerotic plaques. *Front. Cardiovasc. Med.* 2024;11:1307832. (<https://www.frontiersin.org/journals/cardiovascular-medicine/articles/10.3389/fcvm.2024.1307832/full>).
- 70.** Karlin H, Sooda M, Larson M, et al. Plasma Extracellular MicroRNAs Associated With Cardiovascular Disease Risk Factors in Middle-Aged and Older Adults. *Journal of the American Heart Association* 2024;13:e033674. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38860398/>).
- 71.** Polini B, Carpi S, Doccini S, et al. Tumor Suppressor Role of hsa-miR-193a-3p and -5p in Cutaneous Melanoma. *Int J Mol Sci* 2020;21.
- 72.** Bin Yang. The Role of miR-320 Family in Atherosclerosis. *Clinical & Experimental Cardiology* 2021;12:1–4.
- 73.** Zhang R, Qin Y, Zhu G, Li Y, Xue J. Low serum miR-320b expression as a novel indicator of carotid atherosclerosis. *J Clin Neurosci* 2016;33:252–8.
- 74.** Talevi V, Melas K, Pehlivan G, et al. Peripheral whole blood microRNA expression in relation to vascular function: a population-based study. *Journal of Translational Medicine* 2024;22:670. (<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11264787/>).