

**Aus dem Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. Alma Zerneck-Madsen

**Die Funktionen des miRNA 17-92 Clusters in Dendritischen Zellen und deren mögliche
Bedeutung für die Atherosklerose**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Reißler

aus Glattbach

Würzburg, Dezember 2014

Referentin: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen

Koreferent: Prof. Dr. Manfred Lutz

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2015

Der Promovend ist Zahnarzt

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	6
1.1. Atherosklerose.....	6
1.1.1. Übersicht	6
1.1.3. Zellen des Immunsystems in der Atherosklerose	10
1.2. Dendritische Zellen.....	14
1.2.1. Ursprung und Entwicklung von dendritischen Zellen.....	15
1.2.2. Merkmale der unterschiedlichen Populationen von dendritischen Zellen..	18
1.2.3. Wie dendritische Zellen Atherosklerose beeinflussen.....	20
1.3. Micro-RNA – eine weitere Ebene der Genregulation.....	24
1.3.1. Micro-RNA in der Atherosklerose.....	26
1.3.2. Micro-RNA in dendritischen Zellen.....	27
1.3.3. Micro-RNA 17-92 Cluster.....	28
2. Material und Methoden.....	30
2.1. Material.....	30
2.1.1. Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.2. Geräte und Instrumente.....	30
2.1.3. Lösungsmittel & Chemikalien.....	31
2.1.3.1. Zellkulturmedien und Lösungsmittel.....	31
2.1.3.2. Zytokine für die Zellkulturen.....	32
2.1.3.3. Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	32
2.1.3.4. Klonierung, quantitative Real-time PCR und Luziferase Assay.....	33
2.1.3.5. Lösungsmittel und Sets zur Klonierung, qRT-PCR und Luziferase Assay.....	33
2.1.3.6. Zellkulturmedien.....	34
2.1.3.7. Lösungen für die Durchflusszytometrie.....	34
2.1.3.8. Für das Klonieren verwendete Lösungen.....	35
2.2. METHODEN.....	36
2.2.1. Mäuse.....	36
2.2.2. Luziferase Assay.....	36
2.2.2.1. Isolation der DNA.....	37
2.2.2.2. Amplifikation, Isolation und Verdau der 3'UTR Region.....	37
2.2.2.3. Amplifikation Chemisch-kompetente Escheria coli XL10 Bakterien..	38
2.2.2.4. Transformation und Amplifikation des leeren Vektors.....	38
2.2.2.5. Dephosphorilierung.....	39
2.2.2.6. Aufreinigung.....	40
2.2.2.7. Ligation.....	40
2.2.3. Luziferase Assay.....	41
2.3. Quantitative Real-Time PCR.....	43
2.4. Flt3L-Kultur dendritischer Zellen	44
2.5. Durchflusszytometrie.....	44
2.6. Statistische Auswertung.....	45
3. Ergebnisse.....	46
3.1. miRNA 17-92 während der DC-Maturation in einer Flt3L-Kultur.....	46

3.2. Flt3L-DC-Kulturen: Expression von miRNA 17-92 und pDC/cDC-Zellenwicklung.....	47
3.3. Einzelne miRNA des Clusters in Organen von BL-6 Mäusen.....	50
3.4. pDCs in miRNA 17-92 Knock-out / Bl-6 Flt3L DC-Kulturen.....	51
3.5. Luziferase Assays.....	51
3.6. Einfluss von miR19b auf pDCs in Flt3L-Kulturen.....	55
3.7. Rt-qPCR von pDC-mRNA in miRNA 17-92 Knock-out Mäusen.....	56
3.8. Id2 in Gewebe von miRNA 17-92 Knock-out Mäusen.....	57
4. Diskussion.....	59
4.1. Das Micro-RNA 17-92 Cluster in der DC-Maturation.....	59
4.2. Das Micro-RNA 17-92 Cluster in pDCs.....	60
5. Zusammenfassung.....	63
6. Literaturverzeichnis.....	64
7. Abbildungsverzeichnis.....	95

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APOE	Apolipoprotein E
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster der Differenzierung
cDC	Konventionelle dendritische Zelle
CDP	'Common dendritic cell progenitor' Zellvorläufer von dendritischen Zellen
CLP	'Common lymphocyte progenitor' Zellvorläuferzelle von Lymphozyten
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CX3CR1	Chemokiner (C-X3-C) Rezeptor 1
Cy3	Cyanin 3
Cy5.5	Cyanin 5.5
Cy7	Cyanin 7
d	Tag
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäure Triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FCS	Fetales Kalbsserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLT3	'Fms-like tyrosine' Kinase 3
FLT3L	'Fms-like tyrosine' Kinase 3 Ligand
FOXP3	'Forkhead box 3'
g	Gravitationskraft
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonien stimulierender Faktor
HBSS	Hank's physiologische Salzlösung
HEK293F	'human embryonic kidney 293F' = Name der Zelllinie
hi	hoch

HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
ICOS	Induzierbares, kostimulatorisches Molekül
IFN α	Interferon alpha
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
INOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
int	Intermediär
l	Liter
kDA	Kilo Dalton
LB Medium	'Lysogeny broth' Medium
LDL	'Low-density' Lipoprotein
Ldlr	'Low-density' Lipoproteinrezeptor
lo	niedrig
LPS	Lipopolysaccharide
<i>Ly6c</i>	Lymphozytenantigen 6 Komplex
M	Molarität
M-CSF	Makrophagenkolonien stimulierender Faktor
MDP	Makrophagen und DC-Vorläuferzellen
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHCII	'Major histocompatibility complex' zwei
migDC	Migratorische dendritische Zelle
mm	Millimeter
mM	Millimolar
miRISC	Mikroribonukleinsäure induzierter 'silencing' Komplex
miRNA	Mikroribonukleinsäure
mRNA	'Messenger' Ribonukleinsäure
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NF-KB	'Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells'
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nt	Nukleotide
oligo(dT)	Oligodesoxythymidin

OVA	Ovalbumin
oxLDL	Oxidierter 'low-density' Lipoproteine
PAMP	Pathogenassoziierte, molekulare Struktur
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
pre-miRNA	Vorläufer der MikroRNA
pri-miRNA	Primäre MikroRNA
PRR	'Pattern recognition' Receptor
resDC	residente dendritische Zelle
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI-1640	'Roswell Park Memorial Institute' Medium
RT-qPCR	Reverse Transkription mit einer quantitativen Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SMC	Glatte Muskelzelle
TGF- β	'Transforming growth' Faktor beta
Th1	T-Helferzelle Type eins
Th2	T-Helferzelle Type zwei
Tip-DC	TNF-iNOS-produzierende dendritische Zelle
TLR	'Toll-like' Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UTR	Untranslatierte Region
VCAM-1	Vasokläres Zelladhäsionsmolekül eins

1. Einleitung

1. 1. Atherosklerose

1.1.1. Übersicht

Atherosklerose ist eine kardiovaskuläre, chronisch-inflammatorische Krankheit, welche sich durch Ablagerung von Substanzen und Zellen in den Wänden großer Gefäße manifestiert. Vor allem in Industrieländern beobachtet man eine hohe Inzidenz, sodass man von 16,7 Millionen Verstorbenen pro Jahr ausgeht (Dahlof 2010, Lloyd-Jones et al. 2010). Andere Daten beziffern 17,3 Millionen Toten in 2008. Davon sind 7,3 Millionen auf Herzinfarkte und 6,2 Millionen auf Schlaganfälle zurückzuführen (Geneva: World Health Organization 2008). Über 70% der Gesamtbevölkerung besitzen einen oder mehrere Risikofaktoren für Atherosklerose (Dahlof 2010). Klinisch betrifft die Krankheit hauptsächlich in zwei lebenswichtiger Organe (Geneva: World Health Organization; 2007):

Zum einen eine Verengung oder einen Verschluss der Koronararterien, was als koronare Herzkrankheit bezeichnet wird. Diese kann von einer Angina Pectoris bis hin zu einem Herzinfarkt führen. Zum anderen kann eine Verengung oder ein Verschluss der *Arteria carotis* und deren cerebralem Endstromgebiet auftreten. Hierbei kann es zu neurologischen Ausfällen bis hin zu einem ischämischen Schlaganfall kommen.

Die Progression der Krankheit verläuft über Jahre bis Jahrzehnte und wird häufig erst durch klinische Symptome einer zunehmenden Stenose des Gefäßlumens entdeckt (Mendis et al. Geneva: World Health Organization; 2011). Diese atherosklerotischen Plaques sind während der kompletten Lebensspanne eines Menschen präsent. Napoli et al. 1997 fand sogenannte 'Fatty-streaks', welche das Anfangsstadium einer Atherosklerose darstellen, häufig bereits bei Kleinkindern (Napoli et al. 1997). Dieser frühe Läsionstyp ist rein entzündlicher Natur, da er nur aus T-Lymphozyten und Makrophagen, die aus Monozyten hervorgingen, besteht (Stary et al. 1994).

Zunächst wurde in der modernen Medizin angenommen, lediglich passiv akkumuliertes Cholesterol und andere Fette würden die Gefäßwände verdicken (Ross, Harker 1976). Wenige

Jahre danach konnten Jonasson et al. 1980 aktivierte T-Zellen in atherosklerotischen Läsionen nachweisen und rückten somit auch eine Beteiligung des Immunsystems an der Entstehung und Progression der Krankheit in den Vordergrund. Den Verdacht, dass bei einer Atherosklerose auch eine Entzündung vorherrschend ist, hatte 1840 bereits der österreichische Pathologe Carl Rokitansky, welcher durch den deutschen Forscher Rudolf Virchow einige Jahre später in dieser These bestätigt wurde (Mayerl et al. 2006). Während Virchow die Inflammation als einen primären pathologischen Faktor sah, bedachte Rokitansky sie als sekundär (Frostegard 2010). Mayerl et al. konnten 2006 jedoch an Rokitanskys eigenen Originalpräparaten bereits in frühen Stadien der Plaque aktivierte T-Lymphozyten finden und somit Virchows Sichtweise bestätigen. Auf der anderen Seite ist durch zahlreiche Meta-Analysen belegt, dass rheumatische Erkrankungen und die damit einhergehende systemische Inflammation mit erhöhter Plaquebildung vergesellschaftet sind (Tyrell et al. 2010). Somit können beide Behauptungen nicht endgültig verneint werden.

Bei der Initiation der Atherosklerose geht man heute von einer abgewandelten Form der 'Response-to-Injury'-Hypothese durch Russell Ross et al. 1976 aus, bei der man von einer traumatischen Freilegung des Endothels ausging. Inzwischen ist bekannt: das Endothel der Intima wird durch Faktoren stimuliert und reagiert, als wäre es durch ein Trauma verletzt, mit Aktivierung (Moore und Tabas 2011). Zu diesen Faktoren zählen chronische oder systemische Entzündungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus, Infektionen durch Viren, wie Herpes, oder Bakterien wie Chlamydia pneumoniae, Bluthochdruck, freie Radikale aufgenommen durch Zigarettenrauch, erhöhte Homocysteinkonzentration im Blutplasma, genetische Dispositionen und nicht zuletzt eine erhöhte Einlagerung von Cholesterolem und Lipiden in die Gefäßwände (Ross 1976, Libby 2002, Weber et al. 2008, Greenland et al. 2010).

Ein erhöhter Cholesterolgehalt im Blutserum wird auch heute noch als einer der größten Faktoren betrachtet, der den Weg zur Bildung einer Atherosklerose ebnet (Libby et al. 2009). Sogenannte 'Low-Density-Lipoproteins'(LDL) transportieren das Cholesterolem in der Blutbahn. Sie bestehen aus einer Hülle aus Phospholipiden, freiem Cholesterolem und Apolipoprotein B100 (ApoB100), welche in ihrem Inneren verestertes Cholesterolem und Triglyceride enthält (Hansson und Hermansson 2011). Durch den erhöhten Serumgehalt kann sich dieses an der innersten Schicht der Arterienwand, der sogenannten 'Intima', ansammeln und mit ApoB100 an Proteoglykanen der Extrazellulärmatrix binden und beginnt sich dort festzusetzen (Skalen et al. 2002, Tabas et al. 2009). Dort vorherrschende Zellen und deren Enzyme können LDL binden und es unter anderem

spalten, aggregieren, inkorporieren, oxidieren oder unter diabetischen Bedingungen auch glykieren (Steinberg 1997, Khoo 1988, Khoo 1992, Morel et al. 1983).

Dabei entsteht eine breite Variation des LDLs in verschiedenen Oxidationsstufen und Modifikationen. Die oxidierte Form liegt dabei am häufigsten vor, weshalb es als oxidiertes LDL (oxLDL) bezeichnet wird (Hansson and Hermansson 2011). Dieses oxLDL kann über verschiedene Aktivierungspfade Antigen-präsentierende-Zellen (APCs) wie Makrophagen, dendritische Zellen (DCs) und Endothelzellen aktivieren. Diese exprimieren daraufhin Adhäsionsmoleküle oder schütten verschiedene Chemokine aus (Bochkov, Mechtcheriakova et al. 2002, Gargalovic, Gharavi et al. 2006, Gharavi, Alva et al. 2007, Tall 2008).

Durch die Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen können nun mehr Monozyten und Leukozyten aus dem Blutstrom an dieser Stelle in die Intima migrieren (Ibanez, Vilahur et al. 2007). Diese entwickeln sich durch das Chemokin 'Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor' (M-CSF) in weitere Makrophagen (Di Gregoli and Johnson 2012). Interessanterweise sind in atherosklerotischen Läsionen Granulozyten kaum (Stary, Chandler et al. 1995) zu finden und die Immunabwehr wird dort in jeder Phase von T-Lymphozyten und Makrophagen dominiert (Jonasson, Holm et al. 1986, van der Wal, Das et al. 1989). Jedoch wird ihnen heute zunehmend eine Rolle bei der Progression und vor allem der Plaque-Ruptur zugeschrieben (Naruko, Ueda et al. 2002, Eliason, Hannawa et al. 2005, Zerneck, Bot et al. 2008). Im weiteren Verlauf der Krankheit werden immer mehr Makrophagen und Lymphozyten aus dem Blut rekrutiert und vermehren sich innerhalb der Läsion, deren weitere Aktivierung und Ausschüttung von Chemokinen zu weiteren Schäden führt. Das kann in der Ausbildung eines nekrotischen Kerns gipfeln, welcher aus apoptotischen Zellen, Cholesterolkristallen und Zellfragmenten besteht (Shah 1997, Weber and Noels 2011). Natürlicherweise in den Gefäßwänden vorkommende vaskuläre glatte Muskelzellen migrieren in die Plaque und bilden eine Kollagenschicht um diesen nekrotischen Kern, welcher als fibröse Kappe bezeichnet wird und somit dessen Durchbruch in das Gefäßlumen verhindert (Jonasson, Holm et al. 1986). Diese Kollagenschicht wird jedoch von aktivierten Makrophagen ausgeschütteten Stoffen wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) ständig zerstört und damit ausgedünnt (Braganza and Bennett 2001). Somit entsteht zunächst ein Gleichgewicht aus Kollagensynthese und Abbau. Die chronische Entzündung einer Atherosklerose fördert jedoch den Abbau, was letztlich dazu führt, dass eine zu dünne fibröse Kappe unter der Masse der Plaque einreißt und diese Lipidfragmente und Zellüberreste in das Gefäßlumen gelangen (Ovchinnikova, Robertson et al. 2009, Lacolley, Regnault et al. 2012). Sie aktivieren die Gerinnungskaskade und führen somit zur Bildung eines Thrombus, welcher eine Einengung bis hin zu einer vollständigen Stenose des Gefäßes zur Folge haben kann.

Bei der Entschlüsselung der komplexen Krankheit Atherosklerose hat es in den letzten Jahren viele Fortschritte gegeben. Diese beruhen neben Erkenntnissen aus Studien, welche menschliche Präparate untersuchten, und klinischen Studien an Patienten, auch auf Grundlagenforschung mithilfe von Tierexperimenten. Diese bieten den Vorteil, dass mit komplexen Organismen gearbeitet und geforscht werden kann. Aufgrund vieler pathologischer Gemeinsamkeiten hat sich die Maus als ideales Model in der Atheroskleroseforschung durchgesetzt. Kritische Unterschiede zwischen Mensch und Maus bestehen vor allem in stärker erhöhten Fettwerten (Maganto-Garcia, Tarrío et al. 2012), in der Verteilung der Plaque sowie der selteneren Ruptur mit anschließender Thrombose (Bentzon and Falk 2010). Jedoch wird bei vielen menschlichen Patienten die Krankheit erst in diesem späten Stadium entdeckt, weshalb therapeutische Ansätze schwer zu übertragen sind. Andererseits wäre die Entdeckung des Grundes, warum die Ruptur in Mäusen seltener ist, von unschätzbarem Wert, sofern dieser therapeutisch auf Menschen übertragbar wäre. In jüngster Zeit gab es einige Studien, die erfolgsversprechende Daten zur Plaqueruptur entlang der *Arteria Brachiocephalica* in Mäusen lieferten (Matoba, Sato et al. 2013).

Letzlich überwiegen jedoch die Gemeinsamkeiten in Atherosklerose von Menschen und Mäusen. Deshalb und aufgrund der einfachen Haltung, der Möglichkeit der genetischen Manipulation und dem kurzen Zeitraum bis Mäuse eine Atherosklerose entwickeln, wird die Forschung an Mäusen heutzutage präferiert (Getz and Reardon 2012).

Dabei haben sich zwei genetisch-modifizierte Mäuse-Linien besonders bewährt. Zum einen gibt es Mäuse, die kein Apolipoprotein E bilden können, welches unter anderem wichtig zur Bindung von Chylomikronen an Hepatozyten ist. Es resultiert ein höherer Fett- und Cholesterolspiegel im Blut, sodass sogar bei normaler Ernährung der Mäuse komplexe Plaque-Strukturen entstehen können, deren Bildung durch fettreiche Ernährung noch beschleunigt werden kann (Nakashima, Plump et al. 1994). Allerdings änderte sich mit der Ernährung auch der Aufbau der Plaque, welche von Schaumzellen dominiert und weniger komplex strukturiert ist. Der Nachteil dieses Modells: es können keine Knochenmarks-Chimäre erzeugt werden, was bei LDLR⁻ Mäusen möglich ist (Maganto-Garcia, Tarrío et al. 2012). Bei LDLR⁻ Mäusen fehlt der LDL-Rezeptor, der ausschlaggebend zur Aufnahme von LDL in Zellen ist und damit zur Senkung des LDL-Blutspiegels beiträgt.

Ohne die Erforschung der Atherosklerose an Mäusen wären wahrscheinlich auch heute Schlüsselmechanismen dieser Krankheit unbekannt. Viele bestehen aus einer komplexen Kommunikation und Interaktion von Immunzellen, welche viele neue mögliche Wege der Intervention und Therapie der Atherosklerose aufzeigen (Hansson and Hermansson 2011).

1.1.3. Zellen des Immunsystems in der Atherosklerose

Gefäßendothelzellen, vaskuläre-glatte Muskelzellen, Blutplättchen und Immunzellen. Alle spielen eine gewisse Rolle in den verschiedenen Phasen der Atherosklerose, welche heute ohne Zweifel als eine chronische Entzündung der Blutgefäßwände angesehen wird (Hansson and Hermansson 2011). Die Auslösung und Steuerung einer Entzündung im Körper obliegt dem Immunsystem, das in atherosklerotischen Läsionen mit seiner ganzen Vielfältigkeit an Zellen der angeborenen und adaptiven Körperabwehr präsent ist. Ohne Zweifel trägt es damit zur über Jahre andauernden Progression dieser Krankheit bei, weshalb im Folgenden die Zellen näher dargestellt werden sollen, welche nach heutigem Wissenstand entscheidende Auslösemechanismen für diese Progression darstellen.

Wie bereits erwähnt werden Monozyten durch Adhäsionsmoleküle aktivierter Endothelzellen in die Gefäßwände rekrutiert. Sie gehören dem angeborenen Immunsystem an und können auf einem Reservoir in der Milz schnell über den Blutstrom an Orte mit einem Entzündungsgeschehen vordringen (Swirski, Nahrendorf et al. 2009). Hierbei migrieren in der Mehrzahl Monozyten aus der „lymphozyten-antigen-6-komplex“(Ly6c)-Untergruppe (Swirski, Libby et al. 2007). Durch Adhäsionsmoleküle verlassen sie das Gefäßlumen, werden durch weitere Chemokine zusammen mit T-Lymphozyten in die Intima gelockt, durch M-CSF aktiviert und differenzieren sich zu Makrophagen oder DCs (Smith, Trogan et al. 1995, Zernecke, Shagdarsuren et al. 2008). Makrophagen und DCs nehmen dort mithilfe ihrer Scavenger-Rezeptoren, welche zur Gruppe der 'Pattern-Recognition-Receptors'(PRRs) gehören, oxLDL auf und können durch Interaktion über den Major-Histcombability-Complex-II (MHCII) naive T-Zellen zur Differenzierung und Proliferation anregen (Hansson 2006, Greaves and Gordon 2009, Lundberg and Hansson 2010). Jedoch spielen auch andere Rezeptoren bei der oxLDL Aufnahme durch Makrophagen eine Rolle, da die Krankheit auch bei Fehlen dieser PRRs auf der Zelloberfläche nicht zu stoppen ist (Kruth, Jones et al. 2005, Moore, Kunjathoor et al. 2005). Aufgrund einer veränderten histologischen Morphologie, werden diese mit einer Vielzahl an oxLDL beladenen Makrophagen als Schaumzellen bezeichnet, welche ein Charakteristikum einer atherosklerotischen Läsion darstellt (Hansson and Hermansson 2011). Extrazelluläres oxLDL aufzunehmen erscheint zunächst als sinnvolle initial-protective Rolle der Makrophagen, um den Endothelzellen und den glatten Muskelzellen proinflammatorische Reiztrigger zu nehmen (Diaz, Frei et al. 1997, Han, Hajjar et al. 1997). Dieses oxLDL kann durch ABC-Kassetten-Transporter

in „Hoch-dichte-Lipoproteine“ (HDL) verpackt und zur Leber abtransportiert werden (Tall 2008). Andererseits werden durch die Aufnahme auch intrazelluläre Mechanismen ausgelöst, wie die Induktion der Urokinase oder die Ausschüttung proinflammatorischer Substanzen wie Interleukin-1 (IL-1) (Falcone, McCaffrey et al. 1991, Hajjar and Haberland 1997). Unbestritten ist, dass Makrophagen sich unter Einfluss von M-CSF und dem Granulozyten-Makrophagen-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) weiter vermehren können oder aber unter Umständen unter Einfluss von Interferon- γ die Apoptose einleiten und somit zum Wachsen des nekrotischen Kerns beitragen (Ross 1999). Obwohl verschiedene Makrophagen-Untergruppen zu jedem Stadium dieser Krankheit vorhanden sind, scheinen vor allem proinflammatorische M1-Makrophagen bei der Plaqueruptur und Thrombose überhandzunehmen (Woollard and Geissmann 2010, Leitinger and Schulman 2013, Palkama 1991).

Makrophagen dominieren zahlenmäßig in atherosklerotischen Läsionen und stellen mit den Schaumzellen ein typisches Merkmal der Plaque da. Ebenso sind in jeder Phase auch T-Zellen nachweisbar. Sie sind der größte Repräsentant der adaptiven Immunabwehr in atherosklerotischen Plaques und tragen trotz wesentlich geringerem Zahlenverhältnis gegenüber Makrophagen entscheidend zum Wachstum der Plaque und dessen inflammatorischen Destabilisierung bei, nachdem sie *in situ* aktiviert wurden (Hansson, Robertson et al. 2006, Tedgui and Mallat 2006). Durch die oben bereits erwähnte Aktivierung naiver T-Zellen entstehen hauptsächlich T-Helferzellen vom Typus 1 und 2 sowie IL-17 produzierende T-Helferzellen die alle CD4⁺ sind, sowie den T-Zell-Antigen-Rezeptor- $\alpha\beta$ (TCR- $\alpha\beta$) tragen, obwohl auch zahlreiche CD8⁺, sowie einige wenige TCR- $\gamma\delta$ -T-Zellen nachweisbar sind (Hansson, Robertson et al. 2006).

Als unbestritten gilt heute, dass hauptsächlich Typ1 T-Helferzellen (Th1) die Progression der Atherosklerose steuern. Dies stützt sich auf verschiedene Beobachtungen. Als wichtigstes Th1-Zytokin gilt Interferon- γ , welches sich in humanen Plaques nachweisen lässt und dessen intravenöse Substitution in Mäusen zu mehr, sowie dessen Knock-out in Mäusen zu weniger Atherosklerose führt (Hansson, Robertson et al. 2006, Gupta, Pablo et al. 1997, Whitman, Ravisankar et al. 2000). Pathogene Effekte von Interferon- γ stellen sich unter anderem in der vermehrten Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, dünneren Kollagenfaserschichten und einer vermehrten Aktivierung von Endothelzellen und Makrophagen dar (Buono, Come et al. 2003).

Die Initiierung sowie Aufrechterhaltung einer Th1-Immunantwort bedarf unter anderem der Interleukine IL-12 und IL-18 sowie den Th1-Zellen-spezifischen Transkriptionsfaktor (Tbx21). Deren Deletion aus dem Genom von Mäusen führte zu weniger Plaque, wohingegen die intravasale Injektion mit IL-12 und IL-18 in *Ldlr^{-/-}* Mäusen zu mehr Atherosklerose führt (Whitman, Ravisankar et al. 2002, Davenport and Tipping 2003, Elhage, Jawien et al. 2003, Bueno, Binder et al. 2005, Hauer, Uyttenhove et al. 2005).

Th1-Zellen können direkt von modifiziertem LDL aktiviert werden, welches somit entzündungsfördernd auftritt (Zhou, Robertson et al. 2006). Jedoch kann unter gewissen Umständen auch natürliches LDL T-Zellen aktiveren (Hermansson, Ketelhuth et al. 2010), sodass es weiterer Studien bedarf um den genauen Effekt von dieser Bandbreite an modifiziertem und nativem LDL auf T-Zellen in der Atherosklerose zu hinterleuchten (Hermansson, Ketelhuth et al. 2010).

Die Rolle der Typ 2 T-Helferzellen (Th2) in der Atherosklerose bleibt weiterhin unklar. Da ein IL-33, welches eine Th2-Reifung stark vorantreibt (Miller, Xu et al. 2008), injiziert in Mäusen zu weniger Plaquebildung führt, könnten Th2-Zellen antiinflammatorisch wirken, es gibt aber auch Studien das Gegenteil beweisen (Huber, Sakkinen et al. 2001, King, Szilvassy et al. 2002, Davenport and Tipping 2003). Aktuell geht man davon aus, dass die protektiven Wirkungen der Th2-Zellen leicht überwiegen könnten (von Hundelshausen and Weber 2013).

Die Datenlage für IL-17 produzierende T-Helferzellen (Th17) ist ebenso widersprüchlich. (Erbel, Chen et al. 2009, Taleb, Romain et al. 2009, Smith, Prasad et al. 2010). In Bezug auf andere chronisch-inflammatorische Krankheiten werden die Th17-Zellen jedoch als entzündungsfördernd angesehen (von Hundelshausen and Weber 2013).

Wie bereits erwähnt finden sich auch CD8⁺ T-Zellen in atherosklerotischen Läsionen, welche durch verschiedene Zytokine aktiviert zu mehr Plaque in *Apoe^{-/-}* Mäusen führen (Ludewig, Freigang et al. 2000, Olofsson, Soderstrom et al. 2008). *Ldlr^{-/-}* Mäuse denen der PD-L1 oder PD-L2 Ligand zur PD-1 Aufnahme fehlt, weisen massiv vergrößerte und mit CD8⁺ Zellen durchsetzte Plaques auf (Gotsman, Gracie et al. 2007).

Eine weitere Untergruppe von T-Zellen, sogenannte regulatorische T-Zellen (Tregs), welche 1995 erstmals beschrieben wurden (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995), spielen nach heutigem Verständnis eine entscheidende atheroprotektive Rolle, was durch simplen Transfer dieser Zellen

intravenös bereits nachgewiesen werden konnte (Ait-Oufella, Salomon et al. 2006). Im ganzen Körper verhindern sie eine T-Zellreaktion auf körpereigene Antigene und ausufernde Immunreaktionen, weshalb deren Fehlen oder Dysfunktion auch als eine primäre Ursache für Autoimmunerkrankungen nachgewiesen ist (Bennett, Christie et al. 2001, Brunkow, Jeffery et al. 2001). Sind sie erst einmal durch APCs aktiviert, führen sie ihre immunsuppressive Wirkung antigenunabhängig weiter (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Als bezeichnender Zellmarker für Tregs konnte der Transkriptionsfaktor 'forkhead box P3' (Foxp3) ausgemacht werden, welcher auch für deren Funktion essentiell ist (Fontenot, Gavin et al. 2003, Hori, Nomura et al. 2003, Khattri, Cox et al. 2003). Sie können als bereits reife Zellen im Thymus gebildet werden oder peripher aus naiven T-Zellen induziert werden und wirken in atherosklerotischen Plaques unter anderem hemmend auf die T-Zell-Immunantwort (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Antikörper gegen CD3 begünstigen vor allem die Bildung dieser peripheren Tregs bei einer Mäuse-Atherosklerose (Sasaki, Yamashita et al. 2009). Ihre protektive Funktion üben Tregs unter anderem über CD80-86 oder das „zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte-Protein 4“ (CTLA-4) (Ait-Oufella, Salomon et al. 2006 Wing, Onishi et al. 2008), sowie das „Induzierbare-Costimulative-Molekül“ (ICOS) (Kohyama, Sugahara et al. 2004 Gotsman, Grabie et al. 2006) aus. CTLA-4 wird interessanterweise nur auf aktivierten konventionellen T-Zellen exprimiert, während Tregs es ständig exprimieren (Sasaki, Yamashita et al. 2012). ICOS wird ebenfalls auf aktivierten T-Zellen exprimiert (Dong, Temann et al. 2001). Da in Mäusen, welchen ICOS fehlt, auch mehr Plaque und weniger Tregs vorhanden, sind konnte hier der wichtige Einfluss letzterer in der Atherosklerose postuliert werden (Gotsman, Grabie et al. 2006).

Zwei wichtige atheroprotektive Zytokine 'Transforming-Growth-Factor- β ' (TGF- β) sowie IL-10 werden zum einen von Tregs gebildet und wirken ebenfalls positiv auf deren Differenzierung (Kohyama, Sugahara et al. 2004 Mallat, Ait-Oufella et al. 2007, Li and Flavell 2008). Inwieweit Tregs als Zytokin-produzierende Zellen Einfluss in der Atherosklerose nehmen ist umstritten, da sowohl TGF- β als auch IL-10 von vielen anderen Zellen produziert werden kann (Hansson und Hermansson 2011). Ihre protektive Rolle scheinen Tregs somit wahrscheinlicher über Zell-Zell Interaktionen zu erreichen, wobei bisher weder nicht ins Detail noch durch *in vivo*-Studien belegt ist, wie sie die Th1-lastige Immunantwort in der Atherosklerose unterdrücken. Interessante Erkenntnisse sind dafür über die Interaktion von APCs und Tregs bekannt. Dabei wird DCs eine wichtige Rolle in der direkten Treg-Aktivierung zugeschrieben (Tang, Adams et al. 2006). Ferner ist für das bereits genannte CTLA-4 die Fähigkeit beschrieben in DCs die Sekretion von IL-12 (Sato, Tateishi et al. 2005), sowie die Expression von CD80-86 zu unterdrücken und somit ihre Funktion als APCs zu hemmen (Onishi, Fehervari et al. 2008).

Tregs sind in humanen Plaques zwar in jeder Phase der Krankheit, jedoch in geringer Dichte als in der Plaque von Mäusen gefunden worden (de Boer, van der Meer et al. 2007), weshalb sie jedoch keinesfalls uninteressant als Mittel einer therapeutischen Intervention in die menschliche Atherosklerose sind. Auch wenige Zellen können bekanntermaßen durch gezielte Mechanismen großes Kontrollpotenzial ausüben.

Den B-Zellen, als zweite große Säule des adaptiven Immunsystems, wird eine überwiegend protektive Rolle zugeschrieben. Das Fehlen des B-1-Zellen Proliferations-Zytokin IL-5 führt in Ldlr ^{-/-} Mäusen ebenso zu mehr Läsionen als wenn man Apoe ^{-/-} Mäusen die Milz und damit das Hauptreservoir an B-Zellen entfernt, wohingegen eine Substitution von B-Zellen in diese Mäuse atheroprotektiv wirkt (Caligiuri, Nicoletti et al. 2002, Major, Fazio et al. 2002, Hansson and Hermansson 2011). Jedoch wird auch von proatherosklerotischen Eigenschaften der kleineren Untergruppe von B2-Zellen berichtet (Kyaw, Tay et al. 2010).

Wie einleitend beschrieben findet sich das Immunsystem mit seiner ganzen Variabilität in den atherosklerotischen Plaques wieder. Den zuvor bereits mehrfach erwähnten dendritischen Zellen wird aufgrund ihrer Funktion als Bindeglied zwischen angeborenen und adaptiven Immunsystem mittlerweile eine entscheidende Rolle in allen Phasen der Atherosklerose zugesprochen. Ihre Erforschung ist aufgrund ihrer vielen Ursprünge und Zellmarkern komplex und daher soll im folgenden Kapitel näher auf sie eingegangen werden.

1.2. Dendritische Zellen

Die erste morphologische Beschreibung dendritischer Zellen (DCs) geht bereits auf das Jahr 1868 zurück, als Paul Langerhans „fingerförmig-ineinandergreifende“ Zellen in der Haut entdeckte und sie nach sich selbst benannte (Langerhans 1868). Erst hundert Jahre später konnte Langerhans Vermutung, es handele sich um Zellen neurologischen Ursprungs, widerlegt werden (Breathnach, Silvers et al. 1968). In lymphatischen Organen wurde sie 1973 von ihrem Namensgeber Steinman erstmals entdeckt, welcher fünf Jahre später bereits die Aktivierung naiver T-Zellen durch DCs nachweisen konnte (Steinman and Cohn 1973, Steinman and Witmer 1978). Wie wichtig die Rolle der DCs im Immunsystem heute ist zeigt die Verleihung des Nobelpreises für Medizin 2011 an Steinman für die Erforschung dieser Zellen (Lanzavecchia and Sallusto 2011). Heutzutage gelten DCs nicht nur als Bindeglied zwischen dem angeborenen und

adaptiven Immunsystem, ihnen werden auch wichtige Fähigkeiten zugesprochen, als entscheidende Zellen ob ein Antigen toleriert und immunologisch bekämpft wird oder nicht (Steinman 2003, Paul 2011).

Aufgrund ihrer Fähigkeit Antigene aufzunehmen und über die 'Major-Histocompatibility-Molecules' I und II (MHC-I und MHC-II) anderen Zellen zu präsentieren, werden sie wie B-Zellen und Makrophagen zu den sogenannten APCs gezählt (Miloud, Hammerling et al. 2010).

Obwohl bereits heute viel über DCs in Erfahrung gebracht werden konnte, gestaltet sich deren Erforschung nichts desto trotz als schwierig. Sie sind hämatopoetischer Herkunft, können jedoch aus verschiedenen Vorläuferzellen unter verschiedensten Umständen gebildet werden und lassen sich in mehrere Subtypen unterscheiden (Steinman and Inaba 1999). Ferner ist bis heute kein für DCs einzigartiger Zellmarker gefunden worden, sondern vielmehr neigen diese zu großer Variabilität in der Expression von Oberflächenmolekülen unter unterschiedlichen Bedingungen, weshalb *in vitro* Studien von DCs schwer mit *in vivo* Studien von DCs vergleichbar sind (Miloud, Hammerling et al. 2010, Satpathy, Wu et al. 2012). So teilen sich DCs viele Marker mit anderen Zelltypen, was deren generelle Abgrenzung zu Makrophagen für manche Autoren nicht ersichtlich macht (Hume 2008), obwohl diese im Gegensatz zu DCs in der Regel nicht bedeutend zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems beitragen (Gordon and Taylor 2005).

Es ist also ersichtlich, dass DCs für Kontroversen sorgen und auch in Zukunft Diskussionspotential bieten, weshalb im Folgenden die für den Autor aktuell gängigsten DC-Definitionen und -Unterteilungen ausgeführt werden. Dabei werden die konventionellen oder auch klassischen dendritischen Zellen (cDCs) von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) sowie aus Monozyten-hervorgegangenen dendritischen Zellen und Langerhanszellen unterschieden. Diese Arbeit wird sich auf die drei erstgenannten Hauptgruppen fokussieren.

1.2.1. Ursprung und Entwicklung von dendritischen Zellen

Alle myeloiden Zellen entstammen hämatopoetischen Stammzellen, welche sich über verschiedene Zwischenstufen weiter ausdifferenzieren (Lyszkiewicz, Witzlau et al. 2011). Die ersten Vorläuferzellen, sogenannte 'Multi-potente Progenitorzellen' (MPPs), können im Knochenmark noch in alle hämatopoetischen Zellen differenzieren, sich aber nicht mehr selbst erneuern. Sobald sie ihr Potential Erythrozyten, Megakaryozyten oder Lymphozyten zu bilden verloren haben, werden sie als „common-myeloid-progenitors“ (CMPs) bezeichnet (Arinobu, Mizuno et al. 2007). Solche können sich in sogenannte 'Makrophagen und Dendritische Zellen-

Vorläuferzellen' (MDPs) entwickeln und können als unreife Monozyten aus dem Knochenmark in den Blutstrom entlassen werden oder sich weiter in „Common Dendritic-Cell Progenitors“ (CDPs) differenzieren (Belz and Nutt 2012). Es ist jedoch zweifelsfrei nachgewiesen, dass DCs auch aus lymphoiden Stammzellen (CLPs) entstehen können (Manz, Traver et al. 2001). Da diese Art der Differenzierung weitaus seltener als über CMP ist, wird eine Differenzierung in myelotische und lymphatische DCs nach aktuellem Stand als überflüssig betrachtet (Liu and Nussenzweig 2010). CDPs exprimieren weniger CD117, ähneln aber sonst MDPs und können sich in pDCs oder Vorläuferzellen von konventionellen DCs (pre-cDCs) differenzieren und so in den Blutstrom übergehen, jedoch kann aus ihnen kein Monozyt mehr werden (Onai, Obata-Onai et al. 2007, Belz and Nutt 2012). Pre-cDCs tragen CD11c und kein MHCII auf ihrer Oberfläche und können sich nun auch nicht mehr in pDCs umwandeln (Liu, Victora et al. 2009). Sie siedeln sich unter physiologischen Bedingungen in der Milz oder in lymphatischem Gewebe an, wo sie zu cDCs werden (Belz and Nutt 2012).

Oben erwähnte unreife Monozyten können sich nun ebenfalls in verschiedene Zellsubtypen differenzieren. Zunächst unterscheidet man zwischen Ly6C^{high} - und Ly6C^{low} exprimierenden Monozyten, wobei man heute davon ausgeht, dass Ly6C^{low} - aus Ly6C^{high} - Monozyten hervorgehen (Sunderkotter, Nikolic et al. 2004, Arnold, Henry et al. 2007, Varol, Landsman et al. 2007).

Ly6C^{low} - Monozyten scheinen eine negative regulatorische, entzündungshemmende Rolle auszuüben, da aus ihnen sowohl antiinflammatorische Makrophagen wie auch tolerante dendritische Zellen entstehen können (Arnold, Henry et al. 2007, Dominguez and Ardavin 2010). Letztere können die T-Zell Aktivität über einen PD-L1 abhängigen Mechanismus hemmen (Peng, Latchman et al. 2009).

Über den Blutstrom gelangen Ly6C^{high} - Monozyten in beinahe jedes Gewebe und werden dort, unter Einfluss der äußeren Bedingungen, zu gewebstypischen, ansässigen Makrophagen, wie beispielsweise Kupffer-Zellen in der Leber (Diesselhoff-den Dulk, Crofton et al. 1979). Ist in einem Gewebe eine Entzündung vorhanden, so werden dorthin weitere Monozyten rekrutiert und können unter lokalem Einfluss in inflammatorische Makrophagen umgewandelt werden. Aus diesen Monozyten können auch dendritische Zellen werden, man spricht dann von inflammatorischen Monozyten-DCs (mo-DCs) (Swirski, Nahrendorf et al. 2009, Belz and Nutt 2012). *In vivo* wurde dies erstmals von Randolph et al. nachgewiesen, welche ebenfalls herausfanden, dass diese mo-DCs auch in den abfließenden Lymphknoten nachweisbar waren (Randolph, Inaba et al. 1999). Unter Einfluss einer *Listeria monocytogenes* Infektion der Milz

oder des Uroepitheliums durch *Escheria coli* konnten in Mäusen aus aktivierten Monozyten entstandene, sogenannte Tip-DCs nachgewiesen werden (Serbina, Salazar-Mather et al. 2003, Engel, Dobrindt et al. 2006). Diese Benennung beruht auf ihrer Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) sowie induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) (zusammen = Tip). In diesen Studien wurde ihnen eine Rolle bei der Beseitigung der Bakterien zugeschrieben und nachgewiesen, dass sie nicht in der Lage sind eine T-Zell Antwort zu induzieren. Andere Autoren konnten ähnliche Eigenschaften auch für Makrophagen nachweisen, was die Existenz von Tip-DCs als eigenen Zelltypus in Frage stellt (Rydstrom and Wick 2007, King, Dickendesher et al. 2009).

Die Bildung dendritischer Zellen aus Monozyten unter '*steady-state*' Bedingungen bleibt weiterhin kontrovers. Sicher scheint heute, dass CD103⁻ DCs in der intestinalen Lamina propria von Mäusen aus Monozyten differenzieren (Bogunovic, Ginhoux et al. 2009, Varol, Vallon-Eberhard et al. 2009). Auch Tip-DCs konnten bereits in Mukosa-assoziiertem-lymphatischem-Gewebe (MALT) nicht-infizierter Mäuse nachgewiesen werden (Tezuka, Abe et al. 2007). Nichts desto trotz scheinen DCs monozytärer Herkunft nach heutigem Standpunkt nicht den Hauptteil von DCs unter nicht entzündlichen Bedingungen darzustellen (Liu and Nussenzweig 2010).

Abschließend kann man zusammenfassen, dass sich immer noch kein klares Bild von DCs, welche aus Monozyten entstehen, zeichnen lässt. Viele zeigen ähnliche Funktionen wie DCs, unterscheiden sich jedoch in manchen Merkmalen und bewegen sich somit in einer Grauzone zwischen DCs und Makrophagen. Besser hinterleuchtet sind die wichtigsten Zytokine, welche eine DC-Entwicklung einleiten.

Als die wichtigsten Zytokine, welche die Differenzierung von DCs fördern, gelten heute „FMS-tryosine-kinase 3 (Flt3) Ligand“(Flt3L) sowie „Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor“ (GM-CSF) und „Makrophagen-stimulierender Faktor“(M-CSF).

Flt3L wird als das wichtigste Zytokine in der Differenzierung von DCs angesehen. Gibt man Flt3L in murine Knochenmarkskulturen von Vorläuferzellen, so entstehen verschiedene cDCs Subtypen und auch pDCs (Brasel, De Smedt et al. 2000, Brawand, Fitzpatrick et al. 2002). Mäuse die defizient für Flt3L sind (FLKO), haben äußerst wenige pDCs und cDCs in ihren lymphatischen Organen (McKenna, Stocking et al. 2000, Brawand, Fitzpatrick et al. 2002). Noch stärker ist die Abnahme von DCs bei Flt3 Knock-out Mäusen (Waskow, Liu et al. 2008). Dies zeigt, dass Flt3 wahrscheinlich noch andere Liganden während der DC-Differenzierung binden kann als Flt3L, da sonst beide Knock-out Mäuse ungefähr gleich wenige DCs bilden würden. Da weiterhin noch DCs in diesen Knock-out Mäusen gebildet werden, ist das FLT3/FLT3L-System

zwar wichtig, jedoch nicht essentiell für die DC-Entwicklung (Ginhoux, Liu et al. 2009).

Bei der Verabreichung von Flt3L an Mäuse und Menschen zeigte sich ein großes Potential DCs zu generieren (Maraskovsky, Brasel et al. 1996, Pulendran, Banchereau et al. 2000, O'Keeffe, Hochrein et al. 2002). Da bereits CMPs Flt3L⁺ sind und es sowohl dort als auch zu späteren Zeitpunkten Einfluss nimmt, ist noch nicht geklärt wo dessen Fehlen den größeren Effekt verursacht (Fancke, Suter et al. 2008).

Lange galt Flt3L als einziges bekanntes Zytokin, welches zu einer pDCs Entwicklung führt. Diese konnten jüngst auch für M-CSF-Kulturen nachgewiesen werden (Fancke, Suter et al. 2008), dessen Erforschung als DC-Poetin jedoch noch weiterer Studien bedarf.

Ein ebenfalls wichtiger Faktor für die Entwicklung von DCs ist GM-CSF. Dabei entstehen diese unter GM-CSF Einwirkung sowohl aus CDPs als auch aus Monozyten, *in vitro* (Inaba, Inaba et al. 1992, Scheicher, Mehlig et al. 1992, Sallusto and Lanzavecchia 1994). Die Bildung von pDCs wird von GM-CSF jedoch *in vitro* blockiert (Gilliet, Boonstra et al. 2002). Fehlt GM-CSF oder dessen Rezeptor, so führt dies nur zu einer geringen Reduktion von DCs in Mäusen (Vremec, Lieschke et al. 1997), weshalb GM-CSF wahrscheinlich nicht für den Großteil der unter 'steady-state' gebildeten DCs verantwortlich ist. Jedoch sind bei diesen Mäusen in anderen Studien deutlich weniger Migratorischer-DCs in Darm und Haut zu finden gewesen (Bogunovic, Ginhoux et al. 2009, Kingston, Schmid et al. 2009). Der GM-CSF Spiegel ist normalerweise eher gering (Hamilton 2008), kann jedoch unter inflammatorischen Bedingungen ansteigen. Somit könnte GM-CSF hauptsächlich bei der Bildung von DCs bei entzündlichen Vorgängen eine Rolle spielen (van de Laar, Coffey et al. 2012), denn wird GM-CSF Mäusen verabreicht oder überexprimiert, so führt dies zu einer erhöhter Zahl von DCs (Vremec, Lieschke et al. 1997, Daro, Pulendran et al. 2000).

1.2.2. Merkmale der unterschiedlichen Populationen von dendritischen Zellen

DCs sind schwierig von anderen APCs wie Makrophagen abzugrenzen. Sie sind eine Zellpopulation, welche sich in Bezug auf Phänotyp, Lokalisation sowie Funktion als äußerst heterogen erwiesen hat und selbst über diese drei Schlüsselfaktoren nicht eindeutig in Untergruppen zu sortieren ist.

Auf kleinere Subtypen der aus Monozyten-entstandenen-DCs wurde bereits eingegangen, Konventionelle oder auch klassische dendritische Zellen (cDCs) stellen wie erwähnt unter physiologischen Bedingungen den Großteil der DCs dar. Sie sind die mit am besten erforschte Gruppe. Ihnen konnten bereits wichtige Funktionen innerhalb des Immunsystems zugeschrieben werden. Unreife cDCs zeigen zunächst die für APCs typisch hohe Phagozytosefähigkeit und haben wenige MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Sobald sie aber ein Antigen aufgenommen haben vollzieht sich eine Kehrtwende und sie zeigen nur noch wenig Phagozytoseaktivität, haben jedoch MHC I sowie II vermehrt exprimiert (Satpathy, Wu et al. 2012).

Für verschiedene cDC-Untergruppen sind auch diverse weitere Funktionen bekannt. So können sie abhängig davon ob sie bereits aktiviert sind eine T-Zellimmunität oder -toleranz verursachen, (Probst, Lagnel et al. 2003) oder aber auch zur Differenzierung von Tregs beitragen (Yamazaki, Bonito et al. 2007). Ferner können sie „Natürliche Killerzellen“ (NK-Zellen) aktivieren und bei einem Lymphozytenmangel zu deren Proliferation beitragen (Zajt, Sapoznikov et al. 2005, Hochweller, Striegler et al. 2008).

Aufgrund ihrer Zellmorphologischen Erscheinung, die an Plasmazellen erinnert, wird eine Untergruppe „plasmazytoide“ dendritische Zellen (pDCs) genannt. Sie haben CD11c und MHCII exprimiert und sind B220⁺ und PDCA-1⁺. Ihre Haupteigenschaft ist die IFN- α Produktion, vor allem nach viralen Stimuli (Vremec, O'Keeffe et al. 2007). Unter anderem werden pDCs durch Infektionen aktiviert und neigen zu vermehrter Antigenpräsentation, eine Eigenschaft die unter physiologischen Bedingungen bei ihnen nur schwach ausgeprägt ist (Villadangos and Young 2008).

Um den genauen Einfluss von DCs in der Atherosklerose zu verstehen, reicht eine Analyse der Plaques nicht aus, ferner müssen auch umliegende Lymphknoten auf migrierende DCs hin untersucht werden. In sekundären lymphatischen Organen von Mäusen finden sich CD8 α ⁺CD11c⁺; CD8 α ⁻CD4⁻CD11c⁺ und CD8 α ⁻CD4⁺CD11c⁺ cDCs sowie pDCs, TipDCs und CD103⁺CD11c⁺ DCs (Shortman and Liu 2002). Die Rolle letzterer bleibt kontrovers diskutiert. Durch mehrere Studien wurden CD103⁺ DCs im Zusammenhang mit einer regen Proliferation von Tregs beschrieben (Coombes, Siddiqui et al. 2007, Sun, Hall et al. 2007). Sie können allerdings über ihre Retinsäure-Produktion auch eine Th1- und Th17-Differenzierung fördern (DePaolo, Abadie et al. 2011, Hall, Cannons et al. 2011).

Alle verschiedenen DC-Subtypen können durch ihre Eigenschaften im Immunsystem gesteuerte

Prozesse beeinflussen. Daher wird ihnen in Entwicklung und Progression von atherosklerotischen Läsionen eine zunehmend größere Bedeutung beigemessen.

1.2.3. Wie dendritische Zellen Atherosklerose beeinflussen

Wie für viele anderen Immunzellen ist auch die Präsenz von DCs in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen (Weber, Zernecke et al. 2008, Hansson and Hermansson 2011). Sie wurden erstmals 1995 in Aorten gefunden (Bobryshev and Lord 1995) und sind typischerweise subendothelial und vor allem im Übergang von Adventitia in Media zu finden (Ma-Krupa, Jeon et al. 2004, Pryshchep, Ma-Krupa et al. 2008). In Aorten junger Menschen und Hasen wurden ebenfalls bereits unreife DCs nachgewiesen (Millonig, Niederegger et al. 2001). DCs sind in Mäusen vor allem an Stellen zu finden an welchen bevorzugt eine Atherosklerose entsteht, wie dem kleinen Aortenbogen (Jongstra-Bilen, Haidari et al. 2006), wo ihre Zahl ebenso wie die der Makrophagen mit dem Plaquewachstum zunimmt (Mantovani, Garlanda et al. 2009, Soehnlein und Weber 2009). Man geht heute davon aus, dass dieser Anstieg nicht nur durch Zellteilung, sondern auch durch Rekrutierung von DCs aus dem Blutfluss über Adhäsionsmoleküle und Chemotaxis geschieht. Es zeigte sich ebenso, dass Stellen mit vermehrten DC-Ansammlungen eher zur Ruptur der Plaque neigen, weshalb ihnen auch in dieser entscheidenden Phase der Krankheit eine wichtige Rolle zugeschrieben wird (Yilmaz, Lochno et al. 2004, Niessner, Sato et al. 2006).

DCs in atherosklerotischen Läsionen sind unterschiedliche Differenzierungswege gegangen. Über DCs in der Aorta unter physiologischen Bedingungen ist wenig bekannt. Unter inflammatorischen Bedingungen einer Atherosklerose können $CD11b^+CD11c^+$ DCs aus rekrutierten Monozyten hervorgehen (Fogg, Sibon et al. 2006, Liu, Victora et al. 2009). Sowohl aus $Ly6C^{high/low}$ exprimierenden Monozyten können *in vivo* DCs hervorgehen, welcher der beiden Wege in atherosklerotischen Plaques bevorzugt wird, ist trotz einiger *in vitro*-Daten, welche $Ly6C^{low}$ exprimierende Monozyten favorisieren, unklar (Geissmann, Jung et al. 2003, Tacke, Alvarez et al. 2007). Bereits in den Gefäßwänden vorhandene DCs können durch GM-CSF, welches unter inflammatorischen Bedingungen ausgeschüttet wird, proliferieren (Zhu, Chen et al. 2009). Da GM-CSF aber nicht für sein Potential pDCs zu bilden bekannt ist, müssen weitere bisher unentdeckte DC-Bildungswege in atherosklerotischen Plaques vorhanden sein (Auffray, Fogg et al. 2009, Koltsova and Ley 2011).

Welchen Anteil die DCs in der Gruppe der mononuklearen Zellen im Blut eines gesunden Menschen ausmachen ist bisher unklar. Sie und ihre Vorläuferzellen werden über Adhäsionsmoleküle und Chemotaxis in das Innere der Gefäßwände rekrutiert (Zernecke, Shagdarsuren et al. 2008). Dabei scheinen VCAM-1 sowie P- und E-Selektin entscheidend zu sein (Bobryshev, Lord et al. 1996, Alvarez, Vollmann et al. 2008). In Mäusen, welchen spezielle Chemokin-Rezeptoren (CX3CR1, CCR2/5) oder das vaskuläre-Zell-Adhäsionsmolekül-1 (VCAM1) fehlen sind weniger DCs in Plaques zu finden, außerdem haben sie geringere Atherosklerose (Combadiere, Potteaux et al. 2003, Jongstra-Bilen, Haidari et al. 2006, Combadiere, Potteaux et al. 2008, Liu, Yu et al. 2008). Weitere Faktoren, die sowohl Adhäsion von DCs zum Endothel als auch eine Progression der Atherosklerose begünstigen sind: oxLDL, Dyslipidämie, Hypoxie, TNF- α und eine Inhibition der endothelialen NO-Synthase (Weis, Schlichting et al. 2002). Eine hohe Konzentration von oxLDL kann aufgrund seiner zelltoxischen Eigenschaft aber auch zu vermehrter DC-Apoptose führen (Alderman, Bunyard et al. 2002). Ferner kann eine massive Fettstoffwechselstörung zu einer veränderten Zytokinproduktion und einem Überwiegen der Th2-Immunantwort führen (Shamshiev, Ampenberger et al. 2007). Die Zytokinproduktion in DCs ist bei einer Hypoxie dagegen erhöht, ihre Reifung und Eigenschaft der T-Zellaktivierung jedoch beeinträchtigt, weswegen der Gesamteinfluss sauerstoffarmer Gebiete auf DCs noch genauer untersucht werden muss (Mancino, Schioppa et al. 2008).

Auch Blutplättchen, welche eine verletzte Endothelstelle bedecken, können DCs aktivieren und in Gefäßwände rekrutieren (Langer, Daub et al. 2007). Statine konnten in *in vitro*-Versuchen die Adhäsionsfähigkeit von DCs senken (Kofler, Schlichting et al. 2008). Auf der anderen Seite können DCs in frühen Stadien der Atherosklerose auch aus der Läsion austreten und in sekundären lymphatischen Organen proliferieren (Llodra, Angeli et al. 2004, Kabashima, Banks et al. 2005). Diese Emigration ist jedoch in späten Phasen der Krankheit sowie bei Mäusen mit Dyslipidämie nur noch beschränkt möglich, was ein weiterer Grund für den Anstieg von DCs sein könnte (Packard, Maganto-Garcia et al. 2008, Koltsova and Ley 2011).

Um ihre Funktionen in der Atherosklerose ausüben zu können, müssen DCs zunächst aktiviert werden. Sie erkennen potentiell gefährliche Signale oft über 'Toll-like'-Rezeptoren (TLR). Obwohl viele TLR interagieren können, kommt dabei TLR-4 eine entscheidende Rolle zu, da DCs aus Patienten mit dem 'akuten-Koronar-Syndrom' durch ihn aktiviert werden (Wang, Li et al. 2008). Hierbei reagiert TLR-4 auf Lipopolysaccharide, Hitzeschockproteine und modifizierte Autoantigene wie oxLDL (Alderman, Bunyard et al. 2002, Shen, Zhou et al. 2008). Auch das stark proinflammatorisch wirkende C-reaktive Protein kann DCs aktivieren, die dazu führenden

Mechanismen müssen jedoch noch entdeckt werden (Van Vre, Bult et al. 2008).

Obwohl oxLDL, wie oben erwähnt ein Sammelbegriff für die vielen Modifikation der einzelnen LDL Bestandteile ist, scheint es doch widersprüchlich, dass einige Bestandteile auch eine Unterdrückung des TLR-4 Signalweges provozieren können (von Schlieffen, Oskolkova et al. 2009). Generell wird heute aber von einer überwiegenden Aktivierung von oxLDL auf dendritische Zellen über TLR-4 und auch CD36 ausgegangen (Miller, Choi et al. 2011). CD36 ist einer der wichtigsten Rezeptoren zur oxLDL-Aufnahme, welcher auf Makrophagen und moDCs zu finden ist und eine TLR-4/6-Aktivierung begünstigt (Kunjathoor, Febbraio et al. 2002, Stewart, Stuart et al. 2010). Die Herkunft der charakteristischen Schaumzellen wurde alleinig den Makrophagen zugesprochen, obwohl DCs ebenfalls über die Mittel zur Lipidakkumulation verfügen und DC-Marker in Schaumzellarealen nachgewiesen wurden (Paulson, Zhu et al. 2010). Es bedarf noch weiterer Studien um deren exakten Anteil zu beziffern (Koltsova and Ley 2011). Unbestritten ist jedoch, dass DCs durch ihre Lipidakkumulation einen senkenden Einfluss auf den Fettgehalt im Blut in frühen Phasen der Krankheit haben und langlebigere DCs zu einem Niedrigeren, sowie deren Fehlen zu einem erhöhten Cholesterinwert führt (Gautier, Huby et al. 2009, Paulson, Zhu et al. 2010).

Neben der Akkumulation und Modifikation von Lipiden sowie der Sekretion von Zytokinen ist vor allem die Antigenpräsentation zu T-Zellen, welche deren Aktivierung und Proliferation auslöst, eine entscheidende Eigenschaft (Niessner and Weyand 2010).

Dazu müssen DCs, nachdem sie atherosklerotische Antigene aufgenommen haben, aktiviert werden und nach Migration in lymphatisches Gewebe diese Antigene naiven T-Zellen präsentieren, welche eine Th1-Antwort initiieren (Hermansson, Ketelhuth et al. 2010). DCs wurden aber auch in fixierten Aortenproben in unmittelbarer Nähe zu T-Zellen lokalisiert, was ebenfalls auf eine mögliche lokale Interaktion der beiden Zelltypen hinweist (Boulesteix, Pena et al. 2006, Erbel, Sato et al. 2007). Durch eine Markierung von TCR konnten Gruppen von polyklonalen T-Lymphozyten in humanen Plaques entdeckt werden (Stemme, Rymo et al. 1991), die ebenfalls auf eine lokale Antigenpräsentation und T-Zelldifferenzierung hindeuten. Da im Laufe einer Atherosklerose die Auswanderung von DCs abnimmt, könnte letztere Interaktion vor allem in späteren Phasen der Krankheit entscheidend sein (Koltsova and Ley 2011).

Unabhängig vom Ort des Geschehens sind die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 bei der Antigenpräsentation involviert, deren Fehlen zu weniger Plaque in LDLR^{-/-} Mäusen führt (Buono, Pang et al. 2004). CD74 ist in den Prozess der Antigenverarbeitung in DCs eingebunden und folglich reduziert dessen Fehlen in Mäusen eine Atherosklerose (Sun, Hartvigsen et al.

2010).

Abgesehen von der Präsentation von Antigenen, können DCs auch über eine Zytokinproduktion von TNF- α , IL-6 und IL-12 zur Entzündungsreaktion in der Atherosklerose beitragen (Niessner and Weyand 2010). Ein starker Promotor der Atherosklerose ist IL-12, dessen Injektion in ApoE^{-/-} Mäusen zu mehr und dessen Fehlen in Knock-out Mäusen zu weniger atherosklerotischen Plaques führt (Lee, Yen et al. 1999, Davenport and Tipping 2003). DCs können in der Anwesenheit von Diltiazem kein IL-12 produzieren, was zu einer geringeren T-Zellaktivierung führt (Bachetoni, D'Ambrosio et al. 2002). Generell wird durch IL-12 in T-Zellen der Chemokin-Rezeptor CCR-5 vermehrt exprimiert, was zu einer starken Th1-Proliferation in Plaques führt (Zhang, Niessner et al. 2006). ApoE^{-/-} Mäusen, denen entweder TNF- α oder IL-6 fehlt, zeigen ebenfalls eine Plaque-Reduktion. (Branen, Hovgaard et al. 2004, Schieffer, Selle et al. 2004). Außerdem können DCs IL-23 und IL-27, weitere Zytokine der IL-12 Familie, produzieren, welche wahrscheinlich sowohl eine Th1- als auch eine Th17-Differenzierung begünstigen (Kastelein, Hunter et al. 2007).

Auch pDCs wurden in menschlichen und murinen Plaques nachgewiesen (Niessner, Sato et al. 2006, Daissormont, Christ et al. 2011). Bei Patienten mit akuten Koronarsyndrom sind sie wie andere DCs auch in reduzierter Zahl vorhanden (Van Vre, Hoymans et al. 2006). Wie bereits beschrieben, sind sie dafür bekannt, RNA und DNA von Viren und Bakterien aber auch sterbenden Zellen aufzunehmen und vermehrt IFN- α zu produzieren. IFN- α bewirkt eine vermehrte Expression des Moleküls TRAIL auf CD4⁺ T-Lymphozyten, welche daraufhin umliegende Zellen, wie glatte Muskelzellen, zur Apoptose leiten (Sato, Niessner et al. 2006, Niessner, Sato et al. 2006). Außerdem führt IFN- α zu einer Hochregulierung von TLR-4 myeloider DCs (Niessner, Shin et al. 2007) weshalb dieses Zytokin und letztlich pDCs mit einer erhöhten Plaque-Ruptur in Verbindung gebracht werden (Niessner, Sato et al. 2006). Es kann jedoch auch Makrophagen in die atherosklerotischen Läsionen rekrutieren (Goossens, Gijbels et al. 2010).

Um die vielfältigen Funktionen von DCs in den verschiedenen Stadien von Atherosklerose genauer zu verstehen und therapeutisch nutzbar zu machen, bedarf es zunächst einer präzisen Unterteilung der einzelnen DC-Subtypen. Erste Schritte in diese Richtung wurden bereits unternommen (Choi, Cheong et al. 2011, Busch, Westhofen et al. 2014) und so könnten DCs bald eine wichtige Quelle der therapeutischen Intervention in der Atherosklerose darstellen.

Wie DCs in der Atherosklerose, so wird Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) in der Genregulation eine immer entscheidendere Rolle beigemessen. Erste Übersichtsarbeiten über deren Einfluss auf DCs sind bereits erschienen (Busch and Zerneck 2012). Im Folgenden soll die allgemeine Biogenese der miRNAs erläutert werden.

1.3. Micro-RNA – eine weitere Ebene der Genregulation

Micro-RNAs (miRNA) sind kleine untranslatierte Stränge aus Ribonukleinsäure, welche die Translation von messenger-RNAs (mRNA) im Zytosol unterbinden können. Man geht davon aus, dass fast 1% der vorhergesagten Gene von Säugetieren miRNAs kodieren (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2003, Bartel 2004) und diese im Laufe der Evolution unter eukaryontischen Spezies hoch konserviert blieben (Lim, Glasner et al. 2003, Griffiths-Jones, Moxon et al. 2005). Dabei können miRNAs entweder als alleiniges Transkript oder durch Verarbeitung der Introns von Protein-kodierenden Genen entstehen (Bartel 2004). Das Unterbringen von miRNA in Introns spart nicht nur Platz. Gene konkurrierender Proteine können zeitgleich ausgeschaltet und Feedback sowie Feedforward Rückkopplungen geschaffen werden, dadurch sind häufig die gleichen biologischen Prozesse beeinflussbar (Barik 2008, Lutter, Marr et al. 2010).

Einzelne miRNA-codierende Loci werden von den RNA Polymerasen II und III zu einer pri-miRNA transkribiert und im Zellkern durch die RNase Drosha in pre-miRNA mit einer Länge von etwa 70 Basenpaaren prozessiert, welche nun ins Zytosol transportiert werden kann (Lee, Jeon et al. 2002, Lee, Ahn et al. 2003, Lee, Kim et al. 2004, Lund, Guttinger et al. 2004, Han, Lee et al. 2006). Die im Zytosol befindliche RNase DICER macht aus pri-miRNA die finalen 19-24 Basenpaare umfassenden miRNAs, welche nun in den sogenannten RISC ('RNA-induced silencing complex') eingelagert werden können. Dieser sucht die zur miRNA komplementären Bindestellen an der 3' untranslatierten Region (UTR) einer mRNA auf und verhindert entweder dessen Translation oder beschleunigt den Abbau der mRNA durch Deadenylierung des Poly-AAA-Endes sowie durch 'Decapping' (Hutvagner, McLachlan et al. 2001, Ketting, Fischer et al. 2001, Hutvagner and Zamore 2002, Lewis, Burge et al. 2005, Pillai, Bhattacharyya et al. 2007).

Dass RISC diese Ergebnisse erzielt, gilt als unbestritten. Jedoch sind die genauen Mechanismen dahinter noch nicht abschließend geklärt und manche Autoren vermuten noch weitere alternative Regulationswege für miRNA (James, Zhang et al., 2010, Djuranovic et al., 2011, Huntzinger and Izaurralde, 2011). Ferner könnten miRNAs auch die Einleitung der Translation über bis jetzt ebenfalls unbekannte Vorgänge angreifen (James, Zhang et al. 2010).

MRNAs besitzen häufig mehrere Bindungsstellen an denen entweder viele verschiedene oder nur eine spezielle miRNA binden kann (Nielsen, Shomron et al. 2007).

In der Regel üben einzelne miRNAs nur einen geringen inhibitorischen Effekt auf die Proteinlevel des Zielgens aus (Baek, Villen et al. 2008), sodass häufig eine miRNA mehrere Zielgene entlang eines biologischen Prozesses attackiert, um diesen dann in der Summe signifikant zu hemmen. Hierfür beispielhaft ist wie die miRNA 29 eine Herzfibrose inhibiert (van Rooij, Sutherland et al. 2008). Außerdem gibt es noch sogenannte miRNA-Familien. Darin fasst man mehrere miRNAs zusammen, welche ähnliche Bindungssequenzen besitzen und so zusammen ein Zielgen sowie andere diesem Gen zugeordnete Komponenten attackieren. Werden aus einem primären Transkript mehrere miRNAs gebildet, so werden sie als Cluster beschrieben. Im Gegensatz zu diesen beiden Modellen scheint es auch miRNAs zu geben, die sowohl Agonisten als auch Antagonisten eines Prozesses regulieren und somit scheinbar eine Stabilisierung des Balance-Zustandes bewirken, wie beispielsweise miRNA 430 in der Nodal-Signalübertragung agiert (Choi, Giraldez et al. 2007). Trotz mehrerer Zielgene und teils signifikanten Inhibierungen durch einzelne miRNAs, wird diesen heutzutage übereinstimmend eine Rolle in der präzisen Abstimmung von biologischen Prozessen zugeschrieben (Small and Olson 2011).

Obwohl miRNAs hauptsächlich in den Zellen, in denen sie entstanden sind agieren, wurden sie bereits in zahlreichen Körperflüssigkeiten nachgewiesen (Gilad, Meiri et al. 2008, Mitchell, Parkin et al. 2008, Weber, Baxter et al. 2010). Dabei bleiben sie gegenüber der hohen RNase-Aktivität welche extrazellulär vorherrscht lange stabil, weshalb sie von einer schützenden Hülle umgeben sein müssen (Mitchell, Parkin et al. 2008).

Dies geschieht indem sie von der Zelle in Mikrovesikel (MV) abgeschnürt werden, welche man auch als Exosomen bezeichnet (Valadi, Ekstrom et al. 2007, Hunter, Ismail et al. 2008). Prinzipiell sind alle eukaryontischen Zellen im Stande Mikrovesikel zu schnüren (Valadi, Ekstrom et al. 2007). Es zeigten sich allerdings signifikante Unterschiede im miRNA-Profil einzelner Vesikel (Diehl, Fricke et al. 2012). Dieses stimmt häufig auch nicht dem entsprechenden miRNA-Profil der Zelle überein, welche das MV produziert hat, weshalb ein Mechanismus zum geordneten Packen dieser MV existieren muss (Diehl, Fricke et al. 2012).

Ferner können miRNA extrazellulär durch eine Komplexbildung mit Proteinen wie Argonaute-2 oder HDL im Blut ihrer Zersetzung entgehen (Arroyo, Chevillet et al. 2011, Vickers, Palmisano et al. 2011). Es wurden ebenfalls bereits DC-spezifische MV beschrieben, deren Profil jedoch

vom Reifungsgrad der Zelle abhängig ist und deren Austausch bisher nur für DCs untereinander beschrieben ist (Montecalvo, Larregina et al. 2012).

Zusammenfassend lässt sich trotz vielen unentdeckten Mechanismen der miRNAs deren essentielle Wichtigkeit, nicht zuletzt in Bezug auf die interzelluläre Genregulation, nur unterstreichen, weshalb es in diesem Bereich noch viel zu erreichen gibt.

1.3.1. Micro-RNA in der Atherosklerose

Auch im kardiovaskulären System und bei Atherosklerose werden immer mehr miRNA-gesteuerte Prozesse aufgedeckt. Die Wichtigkeit von miRNAs in ihrer Gesamtheit kann am besten mit Hilfe der DICER RNase bestimmt werden, denn deren Fehlen oder Funktionsausfall blockiert alle miRNA gesteuerten Prozesse. So führte dessen Fehlen in Mäuseembryos zu einer frühen Letalität (Bernstein, Kim et al. 2003) und DICER ist essentiell für die Entwicklung der Skelettmuskulatur (O'Rourke, Georges et al. 2007). Außerdem ist DICER während der Herzentwicklung unabdingbar. Selbst wenn es postnatal ausgeschaltet wird, resultiert daraus eine dilatative Kardiomyopathie in Mäusen, welche oft mit Herzversagen einhergeht (Zhao, Ransom et al. 2007, Chen, Murchison et al. 2008). In Endothelzellen ist DICER konstitutiv exprimiert und dessen Funktionsausfall führt zu weniger Proliferation und Kapillarbildung, (Kuehbacher, Urbich et al. 2007, Suarez, Fernandez-Hernando et al. 2007) was letztlich auch in atherosklerotisch erkrankten Gefäßwänden negative Auswirkungen haben würde. Ferner werden weitere kritische Phasen der Krankheit durch miRNAs beeinflusst. MiRNA 126 reguliert die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 in Endothelzellen (Harris, Yamakuchi et al. 2008) und wirkt über eine CXCL12 Expression protektiv (Zernecke, Bidzhekov et al. 2009). miRNA 21 reguliert die Formierung von Läsionen neointimal (Ji, Cheng et al. 2007). In Fibroblasten steuert miRNA 155 das proliferativ-wirkende Angiotensin II (Martin, Lee et al. 2006). Es führt während einer Entzündung zu einer erhöhten Monozytenexpansion und ist in Makrophagen hochreguliert (O'Connell, Taganov et al. 2007, Tili, Michaille et al. 2007, O'Connell, Rao et al. 2008). Außerdem ist miRNA 155 noch in Zellfunktion von T- und B-Lymphozyten, wie auch DCs involviert (Rodriguez, Vigorito et al. 2007, Vigorito, Perks et al. 2007).

Auch in der hämatopoetischen Differenzierung spielen miRNAs eine Rolle, was erstmals 2004 insbesondere für miRNA 181 durch Chen et al. entdeckt wurde (Chen, Li et al. 2004). Die B-Zell Differenzierung reguliert unter anderem miRNA 150 sowie das miRNA 17-92 Cluster, welches in

einem separaten Abschnitt beschrieben wird (Xiao, Calado et al. 2007, Zhou, Wang et al. 2007, Ventura, Young et al. 2008). In die Entwicklung von Monozyten und DCs wird vor allem durch Regulation des M-CSF-Rezeptors von verschiedenen miRNAs eingegriffen (Fontana, Pelosi et al. 2007, Rosa, Ballarino et al. 2007).

Generell bedarf es weiterer Studien um die genaue Rolle von miRNAs in der Atherosklerose zu erklären. Im Folgenden soll der momentane Wissensstand über deren Einfluss in DCs dargestellt werden.

1.3.2. Micro-RNA in dendritischen Zellen

Es sind einige Studien erschienen, die hauptsächlich die Regulation der Differenzierung und Entwicklung von aus Monozyten-entstandenen DCs durch miRNAs beschreiben (Hashimi, Fulcher et al. 2009, Turner, Schnorfeil et al. 2011, El Gazzar and McCall 2012). Auch DC-typische Zellfunktionen als mögliche Regulationsziele werden beschrieben. So inhibiert miRNA 146 in DCs die TLR2-Antwort (Jurkin, Schichl et al. 2010) und kann somit zu einer Endotoxin-induzierten Toleranz von DCs gegenüber aktivierenden Botenstoffen führen (Nahid, Satoh et al. 2011). Erst kürzlich wurde die immunschwächende Wirkung von miRNA 146 auch für pDCs beobachtet (Karrich, Jachimowski et al. 2013). In der Atherosklerose verhindert miRNA 146 eine Entzündungsreaktion von Makrophagen und dämpft deren oxLDL-Inkorporation (Yang, He et al. 2011). Es sind noch weitere Ziele für miRNA 146 in DCs bekannt (Hou, Wang et al. 2009, El Gazzar, Church et al. 2011), sodass ihr insgesamt eine antiinflammatorische Wirkung in DCs zugeschrieben wird, welche aber wohl erst durch einen proinflammatorischen Stimulus ausgelöst wird. Deshalb auch der Vorschlag von Olivieri et al. sie als klinischen Marker für ein entzündlichen Gefäßumbau einzusetzen (Olivieri, Lazzarini et al. 2013).

Weiterhin bekannt sind Regulationsmechanismen von miRNA 155 in Entwicklung und Funktion von DCs (Dunand-Sauthier, Santiago-Raber et al. 2011). So ist in pDCs die IFN- α Ausschüttung nach TLR-4 Stimulation über miRNA 155 reguliert (Zhou, Huang et al. 2010). miRNA 155 ist nach LPS Stimulation ebenfalls erhöht, führt zu einer gesteigerten TNF- α Ausschüttung (Tili, Michaille et al. 2007) und ist in DCs in die T-Zellaktivierung involviert (Rodriguez, Vigorito et al. 2007, O'Connell, Kahn et al. 2010). Murine moDCs, welchen miRNA 155 fehlt, produzieren geringere Mengen IL-12 und besitzen eine geringere Apoptoserate (Lu, Huang et al. 2011). Obwohl antiinflammatorische Signalwege durch miRNA 155 sowohl aktiviert (Ceppi, Pereira et

al. 2009), als auch inhibiert werden (O'Connell, Chaudhuri et al. 2009), geht man heutzutage insgesamt von einer entzündungsfördernden Wirkung von miRNA 155 aus. Viele dieser Studien basieren auf GM-CSF-Kultur-DCs, deren Auftreten hauptsächlich in inflammatorischem Milieu vermutet wird (Hamilton 2008). Ferner bedarf es eines proinflammatorischen Stimulus um miRNA 155 in DCs hochzuregulieren, weshalb dessen Erscheinen *in vivo* hauptsächlich in entzündetem Gewebe vermutet wird.

Neben diesen beiden miRNAs, sind auch viele andere in DCs beschrieben worden, jedoch ist an diesen beiden Beispielen bereits eindeutig veranschaulicht, wie komplex und nachhaltig miRNAs in DC-Zellprozesse eingreifen. Mit zunehmender Erkenntnis wie DCs die einzelnen Stadien einer Atherosklerose prägen, sollte geklärt werden, ob nicht auch miRNA gesteuerte Prozesse darin involviert sind.

1.3.3. Micro-RNA 17-92 Cluster

Das miRNA Cluster findet sich auf dem Chromosom 13 Region q31.3, wird auch als nicht protein-codierendes MIR17HostGene bezeichnet und ist verstärkt in malignen Lymphomen amplifiziert (Ota, Tagawa et al. 2004). Das Gen enthält sechs miRNAs: miRNA 17, miRNA18a, miRNA19a, miRNA19b-1, mRNA 20a und miRNA 92a-1 (Mogilyansky und Rigoutsos 2013). Es ist im Vertebratengenom gut konserviert (Concepcion, Bonetti et al. 2012).

Durch das Studium von Knock-out Mäuseembryos, denen dieses MIR17HostGene fehlt, konnte der miRNA 17-92 Cluster eine wichtige Funktion in der Skelettentwicklung zugeschrieben werden (de Pontual, Yao et al. 2011). Die Mäusen kennzeichneten sich durch das Fehlen und/oder Übergröße einzelner Fingerabschnitte sowie die Verschmelzung der zervikalen Wirbelsäule in Verbindung mit einem Mikrozephalus aus. Hervorzuheben ist ebenfalls, dass in dieser Studie erstmals miRNAs mit menschlichen Syndrom-Patienten in Verbindung gebracht werden konnten. Diese MIR17HostGene Knock-out Mäuse sind aufgrund von einer zu kleinen Ausbildung der Lunge sowie eines ventrikulären Septumdefekts nicht lebensfähig (Ventura, Young et al. 2008). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die miRNA 17-92 Familie essentiell an der Entwicklung von B-Lymphozyten beteiligt ist.

He et al. fanden miRNA 17-92 signifikant häufiger in B-Zell-Lymphomen als in normalen Zelllinien (He, Thomson et al. 2005). In Mäusen bei denen die Tumore durch myelozytomatose Onkogene, wie c-Myc-Expression, wachsen, wurde ein durch miRNA 17-92 induziertes,

schnelleres Wachstum sowie eine geringere Neigung zur Apoptose festgestellt (He, Thomson et al. 2005). Deshalb wurde das miRNA 17-92 Cluster als potentiell Onkogen deklariert.

Die genaue Beziehung des miRNA 17-92 Cluster mit c-Myc-Proteinen wurde durch O'Donnell et al. präzisiert. Diese zeigten, dass miRNA 17 und 91 eine Regression von E2F1, ein wichtiger Transkriptionsfaktor von c-Myc, bewirken (O'Donnell, Wentzel et al. 2005). C-Myc selbst aktiviert jedoch die Transkription von miRNA 17-92 und bewirkt somit eine negative Rückkopplung, was eine genaue Feinregulation der c-Myc Expression ermöglicht.

Durch Untersuchung von miRNAs dieser Familie, gelang es Olive et al. nachzuweisen, dass ein malignes Lymphom durch Überexpression von miRNA 19b genauso invasiv wächst, wie wenn die komplette miRNA 17-92 Familie überexprimiert wird (Olive, Bennett et al. 2009). Hauptsächlich verursacht durch eine Repression der Produktion des Phosphatase-und-Tensin-Homolog-Protein (PTEN), welches eigentlich zu einer Apoptose beiträgt und somit zu vermehrtem Zellüberleben führt (Olive, Bennett et al. 2009).

Weitere Studien entdeckten Apoptose-fördernde Ziele dieser miRNA Familie in Cyclin-abhängiger-Kinase-Inhibitor-1A und B-Zellen-Leukämie/Lymphom-like-Faktor 11 (Xiao, Srinivasan et al. 2008, Inomata, Tagawa et al. 2009).

Triboulet et al. erkannten, dass HIV-1 in infizierten Zellen die Expression von miRNA 17-92 senkte um eine korrekte Virus-Replikation zu ermöglichen (Triboulet, Mari et al. 2007).

Ferner wurde miRNA 17-92 in Endothelzellen entdeckt und dessen Anwesenheit dort mit der Fähigkeit von Endothelzellen, eine neue Gefäßausprossung in ihrer Umgebung zu initiieren, assoziiert (Bonauer, Carmona et al. 2009).

Dem miRNA 17-92 Cluster wird eine zunehmend größere Rolle im Komplex des Immunsystems zugeschrieben. Als Beispiele seien hier die Regulation der Il-10 Produktion in regulatorischen T-Zellen in Lupus erythematodes (de Kouchkovsky, Esensten et al. 2013), die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (Poitz, Augstein et al. 2013) und die Regulation von Effektor und Gedächtnis CD8⁺ Zellen nach einer Infektion genannt (Khan, Penny et al. 2013). Ferner wurde das miRNA 17-92 Cluster auch schon mit kardiovaskulären Krankheiten in Verbindung gebracht (Urbich, Kuehbacher et al. 2008, Zhou, Cai et al. 2013).

In dendritischen Zellen wurde diesem Cluster bisher keine Funktion zugeschrieben, obwohl im Rahmen einer Studie bereits ein miRNA Profil von dendritischen Zellen erstellt wurde und dort die miRNA 17-92 Expression in pDCs aus einer FLT3 Knochenmarks-Kultur stark erhöht und im Gegensatz dazu in cDCs aus GM-CSF Knochenmarks-Kulturen niedrig war. (Kuipers, Schnorfeil et al. 2010)

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

Alle Einwegmaterialien aus Plastik, wie 1-; 1,5-; 15- und 50ml Röhrengefäße, 10- und 15cm Zellkulturplatten, 6-; 24- und 96-Taschenplatten, PCR Röhrchen, Pipettenspitzen und Pipetten wurden vom Hersteller von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen. Die 70µm Zellsiebe, sowie die Injektionsnadeln und Spritzen kommen von BD (Heidelberg, Deutschland).

Scheren und Zangen für die Präparation der Tiere von der Firma Fine Science Werkzeuge (Heidelberg, Deutschland)

2.1.2. Geräte und Instrumente

Folgende Maschinen sind von Thermo Scientific (St.Leon-Rot, Deutschland): Heraeus Heißluftofen, Heraeus Fresco 17 Zentrifuge, Heraeus HERAfreeze -80°C Gefrierschrank und Nanodrop 2000c Spektrophotometer.

Von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) stammen: Zentrifuge 5430R, Multipette Xstream und Thermomixer Comfort – Standard.

Ein C1000 – S1000 Thermischer PCR-Cycler, eine Elektrophoresekammer Sub-cell GT sowie die Spannungsquelle zur Elektrophorese PowerPac Basic Power wurden von der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) bezogen.

Zur Durchflusszytometrie wurde das FACSCantoll von BD (Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Der FLUOstarOPTIMA zur Bestimmung der Lumineszenz stammt von BMG Labtech (Ortenberg, Deutschland).

Von BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl, Deutschland) wurden die Zellkulturbänke SK-12000 bezogen und die Zellkulturinkubatoren stammen von Binder (Tübingen, Deutschland).

Zur Analyse von rtPCR wurde die Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System Maschine von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) eingesetzt.

Alle ansonsten verwendeten Kühl- und Gefrierschränke sind von der Marke Liebherr (Bulle, Schweiz)

Von Sartorius (Göttingen, Deutschland) wurden die Waagen TE3102S und CD225D eingesetzt. Zum Pipettieren wurden Pipetus, eine elektronisch regulierte Pipette der Firma Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland), sowie die Ranin 8x und 12x Multikanal Pipette der Firma Mettler-Toledo (Gießen, Deutschland) und Standard-Pipetten der Volumina 0,5 bis 10 - 10 bis 100 - 100 bis 200 und 200 - 1000µl der Firmen VWR (Darmstadt, Deutschland) und Eppendorf (Hamburg, Deutschland) benutzt.

2.1.3. Lösungsmittel & Chemikalien

2.1.3.1. Zellkulturmedien und Lösungsmittel

Von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) wurde bezogen: Bovines Serum Albumin (BSA), Brefeldin A, Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE), Ethylenediaminetetraacetat Säure, Ionomycin, Mäuseserum, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Kaninchenserum.

Von der Firma Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) wurde RPMI-1640, Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM), FluoSpheres (1.0 µm ,gelb-grün), Hank's physiologische Salz-Lösung (HBSS), Penicillin/Streptomycin, Phosphat-gepufferte Saline (PBS) und β-Mercaptoethanol verwendet.

'Cytotfix', 'Cytotfix/Cytoperm' sowie 'Perm/wash' Puffer-Lösung und 'Stain' Puffer-Lösung wurden von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Pures Ethanol und L-Tryptophan stammt von AppliChem (Darmstadt, Deutschland).

Die Isolationssatz für 'CD11c⁺ Zellen' und 'CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen Kit II' stammen von Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland).

Fetales Kälber Serum (FCS) wurde von PAA (Pasching, Österreich) bezogen.

Ein Set zur Fixation und Permeabilization stammt von eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)

Von Roche (Mannheim, Deutschland) war Liberase Blendzyme TL.

OVA von Hennen-Ovalbumin (323-229 in Aminosäuresequenz) kommt von AnaSpec (Seraing, Belgien).

2.1.3.2. Zytokine für die Zellkulturen

GM-CSF und Flt3L wurde von Peprotech (Hamburg, Deutschland) bezogen.

2.1.3.3. Antikörper für die Durchflusszytometrie

Epitope	Fluorophore	Klon	Hersteller
B220	FITC	RA3-6B2	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
B220	Pacific Blue	RA3-6B2	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
B220	V500	RA3-6B2	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
CD11b	FITC	M1/70	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
CD11b	PerCP-Cy5.5	M1/70	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
CD11b	V500	M1/70	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
CD11c	AlexaFluor488	N418	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
CD11c	PE	N418	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
CD11c	FITC	N418	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
CD11c	PE-Cy7	N418	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
CD45	APC-Cy7	30-F11	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
CD45.1	V450	A20	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
FOXP3	PE	FJK-16s	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
MHCII	APC	M5/114.15.2	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)

			Deutschland)
MHCII	eFlour 450	M5/114.15.2	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
MHCII	FITC	2G9	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
PDCA	PE	eBio927	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
SiglecH	Alexa Fluor 647	eBio440c	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)

Tabelle 1: Antikörper für die Durchflusszytometrie

2.1.3.4. Klonierung, quantitative Real-time PCR und Luziferase Assay

Folgende Primer wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bestellt:

Die Primer sind in 5'-3' Richtung zu lesen.

Name	Sequenz des Primers
Id1-forward	GCG AGA TCA GTG CCT TGG
Id1-reverse	CTC CTG AAG GGC TGG AGT C
Id2-forward	GAC AGA ACC AGG CGT CCA
Id2-reverse	AGC TCA GAA GGG AAT TCA GAT G
Id4-forward	AGG GTG ACA GCA TTC TCT GC
Id4-reverse	CCG GTG GCT TGT TTC TCT TA

Tabelle 2: Primer zur Gewinnung der 3'UTR Region: miRNA Bindungsstelle an Id Proteinen

2.1.3.5. Lösungsmittel und Sets zur Klonierung, qRT-PCR und Luziferase Assay

Von Thermo Scientific (St.Leon-Rot, Deutschland) stammten folgende Präparate: First-Strand cDNA Synthese Set, dNTP Mix, Fast-alkaline Phosphatase, Fast-alkaline Phosphatase Puffer, GeneJet Plasmid Miniprep Set, GeneRuler 1kb Plus DNA Leiter, Maxima SYBR green/rox qPCR Mastermix, *Pfu* Puffer mit Magnesiumchlorid, *Pfu* DNA Polymerase, *Phusion* CG Puffer-Lösung, *Phusion* hot-start II DNA-Polymerase, Proteinase K, T4 DNA-Ligase, T4 DNA-Ligase Puffer-Lösung und Turbofect.

Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) ist der Hersteller folgender verwendeter Mittel: Calciumchlorid, Glukose, Hefe-Extrakt, Isopropanol, LB Medium (Lennox), Natriumacetat, Natriumchlorid, Natrium-dodecylsulfat (SDS) und Trypton.

Von Qiagen (Hilden, Deutschland) kommt: miRNeasy Miniset, miScript II RT Set, miScript Primer Assays, miScript SYBR green PCR Set, QIAquick Gel Extraktion Set, QIAshredder, RNeasy Mikroset und RNeasy Miniset.

Folgende Chemikalien wurden von AppliChem (Darmstadt, Deutschland) verwendet: 2-Amino2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (TRIS), Ethanol, Ethidiumbromid, Magnesiumchlorid und Piperazine-1,4-bis-(2-Ethansulfonsäure) (PIPES).

Puffer O, *NotI* und *XhoI* stammen von New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland).

Opti-MEM und Pre-miR miRNA Vorläufer wurden von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Der Duale Luziferase Reporter Assay und der psiCHECK-2- dualer Luziferase-Reporter-Vektor sind von Promega (Mannheim, Germany).

NulceoBond PC 500 und NucleoSpin RNA II sind von Machery-Nagel (Düren, Deutschland).

Ampicillin wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

LE Agarose stammt von Bioenzym (Hessisch Oldendorf, Deutschland).

Die verwendeten *Escherichia coli* XL 10 wurden von der benachbarten Forschungsgruppe um H.Hermanns, RVZ Würzburg, Deutschland freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.3.6. Zellkulturmedien

DC-Medium

Hierfür wurde RPMI-1640 Medium mit 2mM L-Glutamin und 50µM β-Mercaptoethanol versetzt, 10% FCS und 100U/ml Penicillin/Streptomycin hinzugefügt.

HEK-Medium

HEK293F-Zellen wurden in einer modifizierten DMEM-Lösung gehalten, welche 10% FCS und 100U/ml Penicillin/Streptomycin enthält.

2.1.3.7. Lösungen für die Durchflusszytometrie

Hank's 'Complete'

HBSS wurde 0,6% BSA hinzugefügt und die Lösung auf 300µM EDTA eingestellt.

FACS Staining Puffer-Lösung

PBS wurde mit 2% Mäuseserum versetzt und danach 2% Kaninchenserum und 2% BSA hinzugefügt.

2.1.3.8. Für das Klonieren verwendete Lösungen

LB Medium

Für LB Medium wurde aus 35g LB Medium Pulver mit 1L entionisiertes Wasser eine Lösung hergestellt, welche danach noch autoklaviert wurde.

SOB Medium

20g/L Trypton, 5g/L Hefe-Extrakt und 0,5g/L NaCl wurden in 950ml entionisiertem Wasser gelöst und die Mischung mit 250mM KCL versetzt. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt und das Volumen der Lösung auf 1,0L ergänzt und daraufhin autoklaviert. Danach wurden noch 5ml sterile 2M Magnesiumchlorid-Lösung hinzugeben.

SOC Medium

Es wurde 1L des fertigen SOB Mediums mit 20ml steriler, durch 0,22µm Filtration gewonnene, 1M Glukose-Lösung versetzt.

TAE Puffer-Lösung

Um PCR Produkte über eine Gel-Analyse nachzuweisen wurde TAE Puffer-Lösung aus 40mM TRIS, 20mM Essigsäure und 1mM EDTA verwendet.

Tail Lysis Puffer-Lösung

Dieser bestand aus 10mM TRIS, 10mM EDTA, 10mM NaCl und 0,5% SDS.

Transformationspuffer-Lösung

Um chemisch-kompetente Zellen herzustellen, wurde diese Puffer-Lösung zunächst aus 60mM Calciumchlorid, 10mM PIPES (ph 7) und 15% Glycerol hergestellt und der pH-Wert der Lösung auf 7,0 eingestellt. Danach wurde die Lösung durch ein 0,22µm Sieb filtriert und als steril betrachtet.

'Annealing'puffer-Lösung

Dieser enthält: 100mM Kaliumacetat, 2mM Magnesiumacetat und 30mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure(HEPES)-Kalilauge ph 7,4.

2.2. METHODEN

2.2.1. Mäuse

Folgende Mäuse stammten aus dem Jackson Laboratory (Maine, USA): C57BL/6J (Bl-6), *mir17-92-tm1.1Tyj-/J* (miR-17-92), *B6.Cg-Tg(Itgax-cre)-1-Reiz-/J* (CD11c-cre) und *B6.129S7-Ldlr-tm1Her-/J* (LDLR)

Diese Mäuse wurden im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM), Zinklesweg 10 in 97078 Würzburg gezüchtet und gehalten. Um eine Atherosklerose bei den Tieren hervorzurufen wurde im Alter von sieben bis acht Wochen eine spezielle Diät gefüttert. Von Altromin (Lage, Deutschland) stammt die sogenannte 'High-fat western diet', welche 15% Milchfette und 1,25% Cholesterol enthält und den Ldlr-Mäusen gefüttert wurde. Alle durchgeführten Tierexperimente wurden von den lokalen Behörden genehmigt.

2.2.2. Luziferase Assay

Verwendete Konstrukte: 3'UTR-Fragmente mit miRNA Bindungsstellen von den Id1, Id2, Id4 (Inhibitors of DNA binding)-Protein, welche in einen psiCheck2 -Vektor (Promega) transferiert wurden, werden mit folgenden pre-miRNAs oder mit Kontrollen (anti-miRNA) in HEK271F transfiziert:

Id1 → miRNA 17/ 20

Id2 → miRNA 19a/ 19b

Id4 → miRNA 19a/ 19b

Die miRNA Bindungsstellen an mRNAs der einzelnen Proteine wurden in die entsprechende Multi-Klonstelle des psiCHECK2-Vektors eingefügt.

Im Folgenden soll am Beispiel der miRNA 150 Bindestelle von CD 276 dieses Vorgehen erläutert werden. [Die Daten zu miRNA 150 und CD 276 wurden nicht veröffentlicht]

2.2.2.1. Isolation der DNA

Im Fall der miRNA 150 Bindungsstelle wurde das Oligonukleotid aus Mäusezellen gewonnen und amplifiziert. Dazu wurden zuvor konstruierte Primer 'forward' und 'reverse' eingesetzt, welche die spezielle miRNA Bindungsstelle in der 3' UTR-Region markieren. Diese Primer enthalten ebenfalls Restriktionsstellen für Xho1 und Not1 sowie phosphorylierte 5'-Enden.

Folgendes Design für die CD276 Primer 'forward' und 'reverse' wurde eingesetzt:

CD276-UTR-oligo-for

5' - TCG AG C TGA AAA CAA AGA AGA TGA CGG ACA AGA AAT TGC TTG ATT GGG
AGC TGC TGC CCT TCC CAG GTG GGG GGC CCA CCC TCT GGC AGT GTT GA GC – 3'

CD276-UTR-oligo-rev

5' – GGC CGC TCA ACA CTG CCA GAG GGT GGG CCC CCC ACC TGG GAA GGG CAG
CAG CTC CCA ATC AAG CAA TTT CTT GTC CGT CAT CTT CTT TGT TTT CAG C – 3'a

Die DNA zur Gewinnung der Bindungsstelle stammt aus murinem Bl-6 Blut, welches den Mäusen zuvor aus dem Schwanz entnommen wurde. Diese wurde in 190µl 'tail lysis' Puffer mit 10µl 1mg/ml Proteinase K über Nacht lysiert und danach 10 Minuten bei 20 000g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 300µl 'tail lysis' Puffer-Lösung und 50µl 3M Natriumacetat versetzt und kräftig geschüttelt. Dann wurde 450µl 2-Propanol hinzugefügt und für 30 Minuten bei 20000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das verbleibende DNA Pellet in 500µl Ethanol resuspendiert und bei 20 000g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach dieser Waschung wurde erneut der Überstand entfernt und das DNA Pellet auf dem Labortisch gründlich getrocknet. Anschließend wurde es in 75µl 10mM TRIS (ph 8.0) resuspendiert und die genomische DNA (gDNA) spektroskopisch bestimmt.

2.2.2.2. Amplifikation, Isolation und Verdau der 3'UTR Region

Zur Amplifikation werden die genannten forward und reverse Primer verwendet und folgender PCR-Mix erstellt: 10µl 10X *Pfu* Puffer mit MgCl₂, 1µl 2,5 U/µl *Pfu* Polymerase, 2µl 10mM dNTP Mix, 10µl 70ng/µl B6 gDNA, 2µl 10µM CD276 forward Primer, 2µl 10µM CD276 reverse Primer und 73µl nukleasefreies Wasser. Das PCR Protokoll beginnt mit einer 3 minütigen Aktivierung bei 95°C. Danach werden 40 Zyklen von jeweils 30s bei 95°C Denaturierung, 30s bei 52°C zum Annealing und 2min bei 72°C zur Elongation gefahren. Die folgende finale Elongation dauert 10min bei 72°C.

Nach erfolgreicher PCR wurden die PCR Produkte mithilfe einer Gel-Elektrophorese isoliert. Dazu wurde 2,5%iges Agarose Gel in TAE Puffer verwendet und die Höhe des 3'UTR Region PCR Produkt mithilfe der Banden einer 'double-stranded' DNA Leiter festgestellt und aus dem Gel ausgeschnitten. Um die Banden sichtbar zu machen wurde 20µl 1%iges Ethidiumbromid verwendet. Das 3'UTR Region PCR Produkt wurde mithilfe des QIAquick Gelextraktions Sets nach Beschreibung des Handbuches vom Agarose Gel isoliert.

2.2.2.3. Amplifikation Chemisch-kompetente Escheria coli XL10 Bakterien

Zunächst wurde eine Kultur von *E.coli XL10* in 3ml LB-Medium angesetzt und in einen Brutschrank bei 37°C und 100 rpm über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde diese Kultur in 100ml LB-Medium suspendiert und bei 37°C und 100 rpm solange inkubiert, bis eine optische Dichte von $0,4 < OD_{600}(\text{Optical Density}) < 0,6$ erreicht wurde. Zuvor wurden bereits Röhrengefäße bei -80°C vorgefroren. Die 100ml Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und bei 2500 rpm, 4°C, 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das verbleibende Zellpellet wurde in 50ml Transformationspuffer auf Eis gründlich resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde mit den gleichen Werten wie zuvor zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Diesmal wurde das Zellpellet jedoch nur in 4ml Transformationspuffer kräftig resuspendiert und ebenfalls wieder 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor es in Röhrengefäßen zu je 200µl in flüssigen Stickstoff schockgefroren wurde. Diese nun chemisch-kompetenten *E.coli* Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

2.2.2.4. Transformation und Amplifikation des leeren Vektors

Hierzu wurden 50µl kompetenten *E.coli* Bakterien auf Eis langsam aufgetaut, mit 1µl bzw. <50ng psiCHECK2-Vektor durch leichtes Auf- und Abpipettieren gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde das Röhrchen 90 Sekunden bei 42°C inkubiert und sofort wieder 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Daraufhin wurden 800µl zuvor frisch hergestelltes SOC-Medium aufgefüllt und bei 37°C für 45 Minuten inkubiert.

Von der Lösung wurden 500µl auf eine LB-Agar Platte, welche mit 100µg/ml Ampicillin hergestellt wurde, aufgetragen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Auf der Agar-Platte entstandene Bakterienkolonien wurden mit einer gelben, sterilen Pipettenspitze geerntet. Diese wurde in 250ml flüssiges LB-Medium transferiert, welches ebenfalls 100µg/ml Ampicillin enthält.

Von dieser Kultur wurden 500µl mit 500µl autoklaviertem Glycerol versetzt kurz gemischt und bei -80°C gelagert. Der restliche Großteil wurde bei 37°C und 100rpm über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Inhalt bei 5000rpm, 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das verbleibende Bakterienpellet bei -20°C eingefroren.

Zur Plasmid-Isolation wurde das aufgetaute Pellet luftgetrocknet, indem die Flasche für ungefähr 45 Minuten umgekehrt auf dem Labortisch stand.

Danach wurde das Pellet in 200µl destilliertem Wasser resuspendiert und die optische Dichte ermittelt. Die Volumina der NucleoBond®-Anleitung wurden dann entsprechend der optischen Dichte bei A260nm angepasst. Im Folgenden wurde entsprechend der Anleitung des NucleoBond® Kits die Plasmid-Isolation durchgeführt.

Es folgte ein Doppelverdau des Vektors in der multiplen Klonierungsstelle mit den Restriktionsenzymen NotI und XhoI.

Dazu wurden 5µg der Plasmid DNA mit 1µl NotI sowie mit 2µl XhoI und 3µl Buffer 0 versetzt und der Ansatz auf 30µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Derselbe Ansatz wurde jeweils noch einmal nur mit XhoI und nur mit NotI vorbereitet.

Bei 37°C wurde über Nacht inkubiert. Das Ergebnis wurde per Gelelektrophorese kontrolliert.

2.2.2.5. Dephosphorilierung

Anschließend wurde die Dephosphorilierung mit dem Fermentas Fast Alkaline Phosphatase Kit durchgeführt. 18µl des Verdauens wurden mit 2µl 10X Fast Alkaline Phosphatase Puffer sowie 1µl Fast Alkaline Phosphatase gemischt und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Um das Enzym zu stoppen wurde die Temperatur daraufhin für weitere 20 Minuten auf 80°C erhöht.

2.2.2.6. Aufreinigung

Zur Aufreinigung des linearisierten Vektors wurde vorher hergestelltes Agarose/TBE Gel (50ml mit 10µl Ethidiumbromid) mit dem nun dephosphorilisierten Vektor geladen. Es wurde nach der Dephosphorilierung 4µl 6x DNA loading dye hinzugefügt. Nun wurde es in eine Tasche des Gels eingebracht. Dieses wiederum wurde an 80V Gleichspannung angeschlossen. Da der Vektor 6273bp hat müsste er leicht oberhalb der 5000er Marke der DNA Leiter erkennbar sein. Diese Stelle wurde aus dem Agarose Gel ausgeschnitten und entsprechend der Anleitung des Fermentas Gel Extraktion Satzes isoliert.

2.2.2.7. Ligation

Für die Ligation verwendete man die T4 Ligase. 2µl 10X Ligation Puffer wurden mit 0,3µl 5U/µl T4 Ligase sowie 1µl des verdauten und dephosphorilisierten Vektors zusammengebracht. Das Insert wurde in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 (Vektor:Insert) hinzugefügt und das Volumen mit destilliertem Wasser auf 20µl aufaddiert. Danach wurde bei 22°C für 30 Minuten und darauffolgend bei 60°C für 10 Minuten inkubiert. Zur Kontrolle wurde der Versuch auch mit Vektor ohne Insert beziehungsweise ohne Vektor und mit Insert bei sonst gleichen Bedingungen durchgeführt.

Anschließend wurden wieder wie zuvor beschriebene chemisch kompetente Zellen aufgetaut und mit dem Ligationsansatz sowie den beiden Kontrollen transformiert. Die Transformation war mit dem oben beschriebenen Prozess bis zum Aufbringen auf den Lb-Amp-Agar-Platten identisch. Von diesen wurden nach Übernachtinkubation wieder die Kolonien geerntet. Diese wiederum wurden nun zuerst in ein mit 9µl destilliertem Wasser gefülltes PCR-Röhrchen geschwenkt und

dann erst wie oben im Protokoll erläutert in 250ml LB Medium, welches 50 µg/ml Ampicillin enthält, überführt und inkubiert.

Alle PCR-Röhrchen werden dann noch mit einem PCR Mix aufgefüllt, der pro PCR-Röhrchen folgendes enthält:

1µl Forward-Primer (10µM)

1µl Reverse Primer (10µM)

1µl dNTP Nukleotide

2,5µl 10x Taq Puffer (Fermentas)

1µl MgCl₂ (Fermentas)

0,5µl Taq-Polymerase (Fermentas)

Der Forward-Primer setzt im hRluc-Teil des Vektors psiCheck2 an. Der Reverse-Primer nach der multiplen Klonierungsstelle in psiCheck2.

Der Ansatz wird in folgendem PCR-Zyklus gefahren:

95°C	5min	
95°C	3	30 Zyklen
57°C	60s	
72°C	60s	
72°C	10min	
4°C	∞	

Danach wurden die Ansätze in ein 1,5%iges Agarose Gel transferiert und bei 80V Gleichspannung wie bereits oben beschrieben in einer Gelelektrophorese ausgewertet. Positive Proben sollten eine Bande auf Höhe von ungefähr 6000 bp aufweisen.

Aus den in 250ml LB-Medium inkubierten Bakterien wurde von den positiven Proben ein Glycerolstock wie oben beschrieben hergestellt und aus dem restlichen Inhalt mit Hilfe eines Mini-Prep Sets Nucleo-Bond die DNA isoliert. Das Protokoll entspricht der oben erläuterten Maxi-Prep, lediglich anderen Volumina.

Die so gewonnene Plasmid DNA wird zum Sequenzieren an MWG Operon – Eurofin geschickt.

2.2.3. Luziferase Assay

Am ersten Tag werden HEK Zellen ausgesät, die zu 1×10^5 Zellen pro Milliliter in Dulbecco's Modified Eagle's Medium kultiviert werden. Dieses ist zu 10% mit fetalem Kälberserum und zu 1% mit Pen/Strep ergänzt worden. Ausgesät wurden 50000 Zellen in einem Milliliter pro Tasche in eine 24-Taschen Platte für adhärenente Zellen.

Pro Konstrukt wurden 2 Taschen benötigt. In eine Tasche wurde die zu untersuchende miRNA, in die andere ein Mix verschiedener miRNAs zur Kontrolle gegeben. Zusätzlich wurde noch eine Tasche pro Testreihe mit komplett unbehandelten HEK-Zellen gefüllt.

Die Transfektion wurde am nächsten Tag durchgeführt. Dazu wurde pro Tasche ein Ansatz erstellt.

1. Ansatz für Taschen mit der zu untersuchenden miRNA:

- 94µl OptiMEM
- 5µl der zu untersuchenden miRNA(30nM)
- 1µl Plasmid DNA psiCHECK2-Vector
- 2µl Turbofect

2. Ansatz für Taschen mit verschiedenen miRNAs zur Kontrolle:

- 89µl OptiMEM
- 10µl Kontroll-miRNA (30nM)
- 1µl plasmid DNA psiCHECK2-Vektor
- 2µl Turbofect

Diese beiden Ansätze wurden mit einem Vortexmixer kurz geschüttelt und danach 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgend werden sie tröpfchenweise zu den vorbereiteten Zellen gegeben und diese 24 Stunden bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. Die unbehandelten Kontrollen erhielten ausschließlich Opti-MEM.

Am Folgetag wird ein DualGlo Luciferase Assay der Firma Promega durchgeführt. Hierzu benötigt man eine 96-Taschen-Platte.

Ein UTR-Konstrukt einer mRNA, welches keine Bindungsstelle für eine Kontroll-miRNA aufweist, zeigt ein Leuchten im Luminometer. Dagegen sollte ein UTR-Konstrukt, welches mit einer relevanten miRNA zusammengeführt wurde, durch deren Inhibition eine geringere Luciferase Aktivität aufweisen.

Zuerst wurden die einzelnen Taschen der Platten auf gleichmäßigen Bewuchs mit HEK-Zellen unter einem Mikroskop untersucht, um einen in den Vortagen begangenen Fehler in der Quantität auszuschließen. Das Zellmedium wird aus den Taschen vorsichtig abgesaugt und die adhärenen HEK-Zellen verbleiben. Nun wurde 1ml PBS pro Tasche vorsichtig eingespült ohne die Zellen abzulösen. Danach wurde das Dual Glo Reporter Assay Kit der Firma Promega nach Anleitung manuell durchgeführt. Die Zugabe des 'Glow' und 'Stop & Glow' geschah automatisch im Luminometer.

Das Luminometer speichert die Daten in einer Excel Datei. Die unbehandelten Proben sollten kein durch Firefly oder Renilla erzeugtes Leuchten zeigen. Deren Werte in der Tabelle sind also als Hintergrundleuchten oder mögliche Autoaktivierung der Firefly oder Renilla zu sehen und wurden, nachdem die Triplettens normalisiert wurden, von den restlichen Proben subtrahiert. Das jeweilige Gen von Interesse wurde mit dem 3'UTR Ende hinter das Renilla Gen in einem psicheck2 Vektor ligiert. Die Firefly Lumineszenz entspricht hier einer internen Kontrolle. Die Analyse wurde entsprechend der Anleitung durchgeführt und die Hemmung der Lumineszenz in Prozent angegeben.

2.3. Quantitative Real-Time PCR

Die entnommenen Organe wurden durch kurzes Tauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Danach wurden die Organe mit Hilfe von Mörsel, Pistill und flüssigem Stickstoff auf Trockeneis fein zermahlen.

Nun wurden sie in 1ml Trizol (Invitrogen) überführt und resuspendiert. Danach wurde 200µl Chloroform hinzugefügt und das Gefäß gut geschüttelt. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde unter 4°C für 15 Minuten mit 12000x zentrifugiert.

Die nun entstandene obere transparente Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette aufgezogen und in ein neues 2ml Eppendorf-Gefäß überführt.

Zu der Flüssigkeit wurde im Verhältnis 1:1 100%iges Ethanol gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

Dies entspricht bereits Schritt 4 des Rneasy Mini Handbuchs (Qiagen 09/2010) zur miRNA-Isolation, dessen weiteres Protokoll durchgeführt wurde.

Die isolierte RNA wurde nun mithilfe einer optischen Dichtemessung quantifiziert.

Darauf folgte die Umwandlung der RNA in cDNA mithilfe des 'first strand cDNA Synthese' Kits

nach der Anleitung des Herstellers.

Zur Amplifikation der cDNA wird eine quantitative Real-Time PCR in 10µl Skalierung durchgeführt. Dabei wurden dem SYBR green/POX qPCR Mastermix 20ng cDNA und jeweils 500nM Primer hinzugefügt und die Reaktion im Zykler QIAgility gestartet:

1. 95°C	15min	
2. 95°C	15s	
3. 60°C	30s	40 Zyklen
4. 72°C	30s	
5. 95°C	15s	
6. 60°C	15s	
7. 95°C	15s	

Die Ergebnisse wurden über die ddCt Methode analysiert (Livak und Schmittgen 2001).

2.4. Flt3L-Kultur dendritischer Zellen

Einer 8-12 Wochen alten Bl-6 Maus wurden beide Oberschenkelknochen entnommen. Diese wurden von Weichgewebe und Muskeln gereinigt und dann in 70% Ethanol gewaschen.

Danach wurden sie in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelegt. Beide Enden der Knochen wurden entfernt und mit einer Kanüle (Braun Melsungen) das enthaltene Knochenmark mit Hilfe von PBS ausgespült, durch einen 70µm Zellsieb gerieben und in einen Behälter aufgefangen. Die dort enthaltene Zellsuspension wurde bei 350g/4°C/5min zentrifugiert und in 1ml DC-Medium resuspendiert. Die Zellkonzentration in der Suspension wurde auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und jeweils 20ng/ml Flt3L sowie 50ng/ml murines Stammzellenfaktor (mSCF) hinzugeben. Die Zellsuspension wurde dann in einer Zellkulturschale transferiert und in einem Zellbrütschrank inkubiert.

Flt3L wurde an den Tagen zwei, vier, sechs und neun erneut mit 20ng/ml hinzugefügt.

Die Zellzahl der Kultur wurde an den Tagen drei, vier, fünf, sechs, sieben, zehn und elf gemessen und wieder zu 1×10^6 Zellen/ml DC-Medium entsprechend eingestellt.

2.5. Durchflusszytometrie

Die Zellsuspensionen wurden in Hank's Complete Lösung gewaschen, bei 350g/4°C/5min zentrifugiert und in 25µl Hank's Complete Lösung und 25µl FACS Staining Puffer-Lösung resuspendiert. Die jeweiligen Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:300 hinzugefügt und die Zellen unter Lichtschutz für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden weitere 100µl Hanks's Complete Lösung hinzugefügt, die Zellen bei 350g/4°C/5min zentrifugiert und in 200µl Hank's Complete Lösung resuspendiert. Es wurde ein weiteres Mal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und wieder in 200µl Hank's Complete Lösung resuspendiert. Es folgte sofort die Messung an der Durchflusszytometrie.

2.6. Statistische Auswertung

RT-qPCR Daten wurden mit 'Life Technologies Sequence Detection Systems (SDS) 2.4.1. (Darmstadt, Deutschland) ausgewertet. Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind mit Hilfe von 'Treestar FlowJO 10.0.4.' (Ashland, USA) analysiert worden.

Alle Ergebnisse wurden in 'GraphPad Prism 5.02. (La Jola, USA) in Grafiken illustriert.

Mithilfe des t-Tests oder dem Mann-Whitney-Test wurde je nach Versuchsaufbau die Normalverteilung überprüft. Der Grubbs-Test wurde angewendet um signifikante Ausreißer ($p < 0,05$) auszuschließen.

Unterschiede von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angegeben.

Mögliche miRNA Ziele wurden durch mirSVA Datensätze von microrna.org unter Verwendung des mirSVA Algorithmus auf miRanda-prognostizierten Micro-RNA Ziel-Regionen gesucht (Betel, Koppal et al., 2010).

3. Ergebnisse

3.1. miRNA 17-92 während der DC-Maturation in einer Flt3L-Kultur

Um herauszufinden, ob einzelne Mitglieder des miRNA Clusters 17-92 auch während der Entwicklung von DCs unter steady-state Bedingungen regulatorische Funktionen ausführen, wurde eine Flt3L DC-Kultur angelegt und dieser nach vier, acht, neun und zehn Tagen Zellen entnommen. Deren miRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und über eine reverse Transkription mit Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) quantifiziert. Hierbei wurden die Tage acht, neun und zehn auf Tag vier als Ausgangswert normalisiert. Es handelt sich hierbei um Einzelwerte, welche daher keine statistische Aussagekraft besitzen.

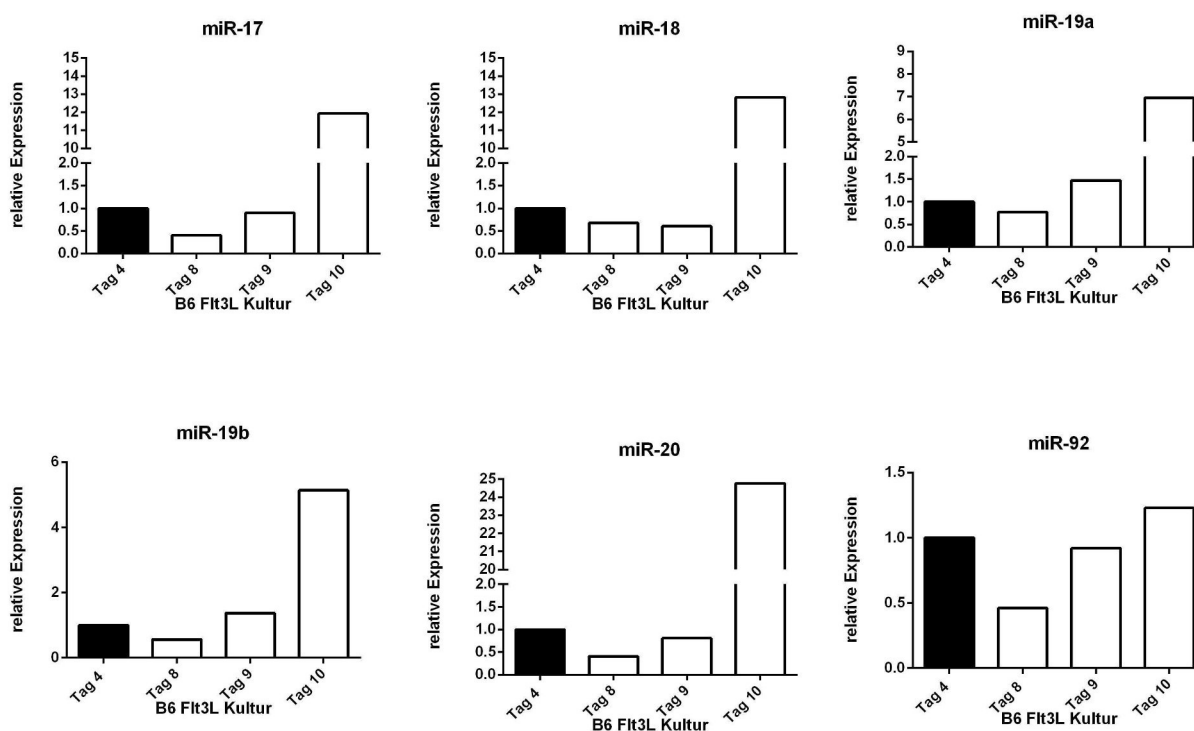


Abbildung 1: relative Änderung der Expression des miRNA Clusters 17-92 in einer Flt3L-Kultur aus Knochenmarkszellen des Femurs von acht bis zwölf Wochen alten B6 Mäusen, welche über einen Zeitraum von 10 Tagen kultiviert wurden. Es wurden jeweils an Tag vier, acht, neun und zehn Zellen entnommen und über eine RT-PCR die relative Häufigkeit der einzelnen miRNAs des Clusters bestimmt.

Alle miRNAs stammen von einem Transkript und so wundert es zunächst nicht, dass alle ähnlich exprimiert werden. Die Zahl nimmt vom vierten auf den achten Tag leicht ab, um dann aber innerhalb von zwei Tagen am zehnten Tag generell deutlich anzusteigen. Dieser Anstieg fällt interessanterweise jedoch bei einzelnen miRNA des Clusters unterschiedlich aus und ist bei miRNA 92 nur äußerst gering. Generell lassen diese Ergebnisse die Vermutung zu, dass Mitglieder des miRNA 17-92 Clusters wenig in den Ausreifungsprozess von DCs eingreifen, jedoch in entstandenen DCs eine regulatorische Rolle spielen könnten.

3.2. *Flt3L-DC-Kulturen: Expression von miRNA 17-92 und pDC/cDC-Zellenwicklung*

Um die vorherigen Ergebnisse zu validieren, wurde erneut eine Flt3L-Kultur angesetzt. Diesmal wurden bei der qRT-PCR die Mitglieder des miRNA 17-92 Clusters mit der Expression von snoRNA73a verglichen. SnoRNA73a ist eine kleine, im Zellkern vorkommende RNA, welche in Vertebraten konstitutiv und gleichbleibend exprimiert wird. Außerdem wurden an den gleichen Tagen Zellen aus den Kulturen entnommen um über eine Durchflusszytometrie die Zahl der pDCs und cDCs zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 2 und 3 dargestellt. Die relative Quantität gegenüber snoRNA73a ist mit 10 bis 25% bei miRNA 92 am größten. miRNA 92 vollzieht im Zeitverlauf auch die deutlichsten Schwankungen. Mit ungefähr 1-4% folgen miRNA 17 und 20, die gegenüber den anderen miRNAs nach ihrem ersten Peak am Tag fünf deutlich langsamer in ihrer Expression abfallen. Die restlichen drei miRNAs (miRNA 18, 19a und 19b) sind teils unter 0,1% bis 0,5% relativ zu snRNA73a exprimiert. Betrachtet man nur den neunten und zehnten Tag, stehen diese Werte in Übereinstimmung mit denen aus der vorigen Analyse des miRNA Profils von DCs. Auffällig in diesem Zeitverlauf ist der starke Anstieg der pDC- und cDC-Zahl vom dritten bis zum fünften Tag. Am fünften Tag erreichen auch die einzelnen miRNAs des Cluster ihren absoluten Höchstwert. Danach folgen ihre Kurven tendenziell eher der cDC-Zahl, welche im weiteren Verlauf ab dem siebten Tag eher abnimmt, während pDCs auch danach weiter proliferieren.

Andererseits steigt zwischen Tag vier und fünf die Zahl der pDCs sowie die Expression des Clusters deutlich, während cDCs in diesem Zeitraum nicht ganz so stark proliferieren. Der zweite

kleine Peak der einzelnen miRNAs in ihrer Expressionsrate am zehnten Tag fällt wieder mit einem starken Anstieg der pDCs zusammen. Somit könnte das Cluster in unreifen DCs eine Ausreifung in pDCs begünstigen oder auch in cDCs eine Umwandlung in pDCs bewirken. Dies kann von miRNAs durch das Binden von mRNAs solcher Proteine, welche eine pDC-Entwicklung blockieren, realisiert werden. Dies ist für die Id-Familie (*Inhibitoren der DNA Bindung*), speziell Id2, beschrieben (Spits, Couwenberg et al. 2000, Cisse, Caton et al. 2008, Nagasawa, Schmidlin et al. 2008).

Id1, Id2 und Id4 sind Proteine, welche im Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Alterungsprozess eine Rolle spielen können. Als sogenannte 'Helix-Loop-Helix'-Proteine (HLH) können sie Heterodimere mit fundamentalen HLHs bilden, welche prinzipiell als Transkriptionsfaktoren auftreten. Sie besitzen also keine eigene DNA-Bindungsstelle, sondern inhibieren die Bindungsstelle anderer fundamentalen HLH-Proteine, auch E-Proteine genannt. Diese Inaktivierung geschieht auch über die oben bereits erwähnte Heterodimer-Bildung (Pagliuca, Bartoli et al. 1995). Die wichtige Funktion dieser Id-Proteine wird von Yokota et al. (1999) verdeutlicht. Mäuse, die kein Id2 exprimieren können, besitzen keine peripheren Lymphknoten oder Peyer'sche Plaques und zeigen eine deutlich reduzierte Zahl an Natural-Killer-Zellen (Yokota, Mansouri et al. 1999). Ferner ist Id2 in cDCs exprimiert und wird für die Entwicklung von speziellen cDC-Untergruppen wie Langerhanszellen und CD8⁺ cDCs benötigt (Hacker, Kirsch et al. 2003). Außerdem blockt dessen Anwesenheit die pDC-Entwicklung in *in vitro*-Versuchen (Spits, Couwenberg et al. 2000, Nagasawa, Schmidlin et al. 2008).

In peripheren CD4⁺ T-Zellen führt Id1 Expression zu einer erhöhten Proliferation und verlängerter Überlebensdauer (Liu, Jin et al. 2013). Somit ist prinzipiell auch eine Id1 gekoppelter Zellmechanismus in eng mit CD4⁺ T-Zellen interagierenden DCs denkbar. Ferner könnte auch miRNA aus DCs in T-Zellen gelangen und dort den oben genannten Mechanismus inhibieren.

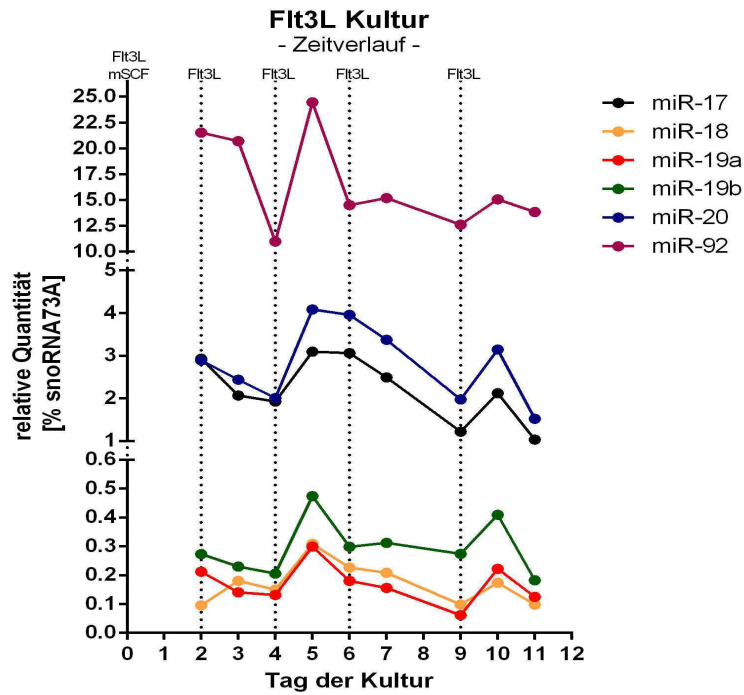


Abbildung 2 zeigt die Änderung der Expression einzelner miRNAs des miRNA 17-92 Clusters in einer Flt3L-Kultur dendritischer Zellen. Dazu wurden dieser täglich Zellen entnommen und deren RNA isoliert. Diese wurde in einer qRT-PCR in Bezug zur ubiquitär vorkommenden snoRNA73a quantifiziert. Die Grafik zeigt Einzelwerte, ohne statistische Relevanz

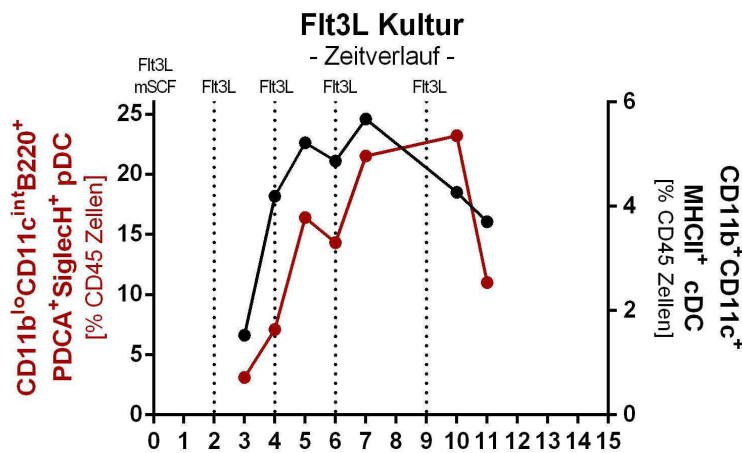


Abbildung 3 zeigt die Änderung der Expression einzelner miRNAs des miRNA 17-92 Clusters in einer Flt3L-Kultur dendritischer Zellen. Dazu wurden dieser täglich Zellen entnommen um mittels Zellsortierer die relative Menge an pDCs und cDCs in der Kultur zu bestimmen. Die Grafik zeigt Einzelwerte, ohne statistische Relevanz

3.3. Einzelne miRNA des Clusters in Organen von BL-6 Mäusen

Generell lassen die absoluten Zahlen der Expression des miRNA 17-92 Clusters in einzelnen Organen von BL-6 Mäusen zunächst wenig Rückschlüsse auf dessen Wirken in DCs zu, da die dortige Präsenz anderer Zellen die Ergebnisse relativiert. Erst in Verbindung mit der Expression einzelner potenzieller Target-Proteine in den Organen von BL-6 Mäusen und dann vor allem deren Vorkommen in Organen von den Mäusen, denen in CD11c⁺ Zellen das miRNA 17-92 Cluster fehlt, lassen sich wichtige Rückschlüsse ziehen. Obwohl alle miRNAs des Clusters aus einem primären Konstrukt entstehen, sieht man in Abbildung 4, dass miRNA 19a und b in den peripheren Lymphknoten leicht häufiger vorkommen und miRNA 17, 18 und 20 in der Milz leicht erhöht sind. Da die Werte relativ zu einander betrachten wurden, lassen sich keine generellen Rückschlüsse auf das Expressionsniveau in einzelnen Organen ziehen.

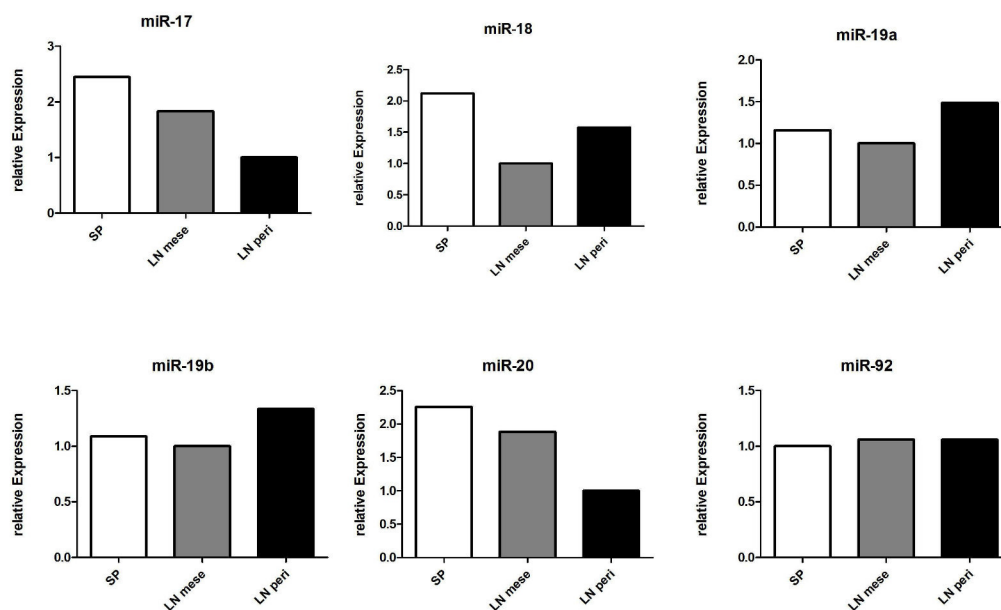


Abbildung 4 zeigt die relative Häufigkeit einzelner miRNAs des miRNA 17-92 Clusters in Organen von BL-6 Mäusen. Dazu wurden den sechs bis acht Wochen alten Tieren die jeweiligen Organe entnommen und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff fein gemahlen. Danach wurde die RNA extrahiert in cDNA umgeschrieben und mithilfe einer RT-PCR die relative Menge der einzelnen miRNAs bestimmt, wobei der niedrigste Wert als Norm verwendet wurde. Es handelt sich um Einzelwerte, ohne statistische Relevanz.

3.4. pDCs in miRNA 17-92 Knock-out / Bl-6 Flt3L DC-Kulturen

Um den Einfluss des miRNA 17-92 Clusters auf die Maturation von pDCs abschätzen zu können, wurden Flt3L-Kulturen von drei Bl-6 und zwei CKO Mäusen angelegt und an den Tagen vier, fünf, sechs und sieben die absolute Zahl von pDCs über eine FACS Analyse bestimmt. Diese Daten stehen in Widerspruch zu dem Experiment unter Punkt 3.2, Abbildung 3 davor, in dem die pDC-Zahlen von Bl-6 Mäusen vom sechsten bis siebten Tag stärker anstiegen und dann erst stagnierten. Allerdings wurde in diesem Fall deren absolute Zahl und nicht wie zuvor deren prozentualer Anteil von CD40⁺ Zellen bestimmt, was den steileren Anstieg zuvor erklären könnte. Die Zahl der pDCs in den Kulturen aus CKO Mäusen gleicht der in den Kontroll-Kulturen bis zum sechsten Tag, um dann am siebten Tag anzusteigen.

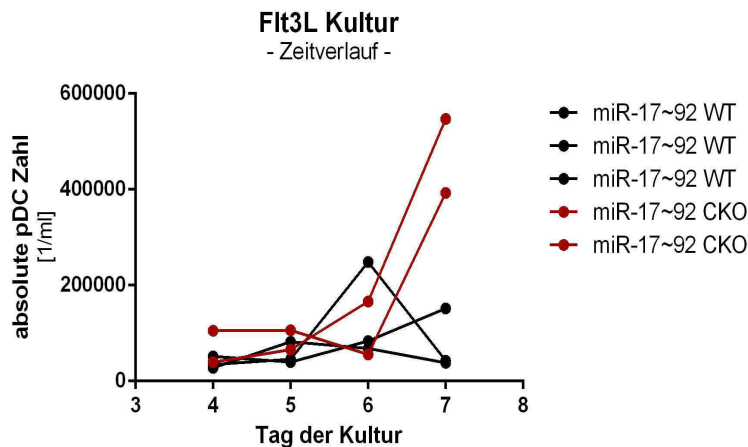


Abbildung 5: Zeitverlauf von fünf Flt3L-Kultur dendritischer Zellen aus Wildtyp Mäusen und konditionellen Knock-out Mäusen. An Tag vier, fünf, sechs und sieben wurden die Zellzahlen der Kulturen bestimmt und in den Graph eingetragen. Zu Beginn wurde den Kulturen mSCF und Flt3L zugesetzt, sowie am zweiten, vierten und sechsten Tag nochmals Flt3L eingebracht. Es handelt sich um Einzelwerte, ohne statistische Aussagekraft.

3.5. Luziferase Assays

Um herauszufinden ob der jeweils starke Anstieg von pDCs an Tag fünf und zehn in Abbildung 3 mit den miRNAs (Abbildung 2) sowie an Tag sechs in Abbildung 5 zusammenhängen könnte,

wurde nach möglichen Target-Proteinen des miRNA 17-92 Clusters gesucht. Hierbei konzentrierte sich die Suche auf Ziele, die in der Entwicklung von DCs eine Rolle spielen. Von über 7000 möglichen Targets des miRNA 17-92 Clusters (Betel, Koppal et al. 2010) sind die *Inhibitors of DNA binding 1, 2 und 4* (Id1, Id2 und Id4) besonders aufgefallen, da sie Differenzierungen normalerweise verhindern (Yokota 2001).

Folgende Bindungsstellen des Clusters an Id Proteinen sind laut microrna.org vorhanden:

An der murinen mRNA des Id1 hat miRNA 17 eine Bindungsstelle ab der 370. Position vom 5' Ende und miRNA 20 eine sich mit der von miRNA 17 überschneidende Stelle ab dem 367. Basenpaar.

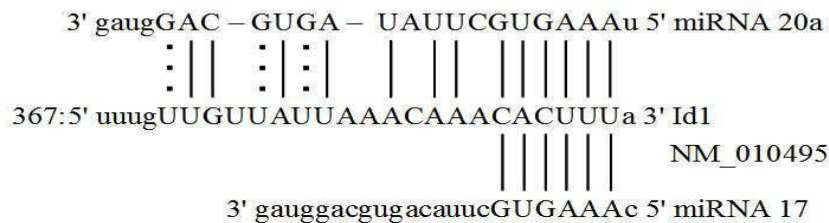


Abbildung 6: mögliche Bindungsstellen von miRNA 17 und miRNA 20a an Id1

MiRNA 19a und 19b haben ab der 40. Base des 5' Endes der Id2 mRNA eine mögliche Bindungsstelle und an Id4 ebenfalls eine gemeinsame Bindungsstelle ab der 207. Position des 5' Endes.

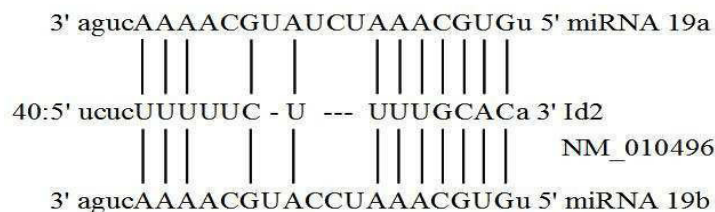


Abbildung 7: mögliche Bindungsstellen von miRNA 19a und miRNA 19b an Id2

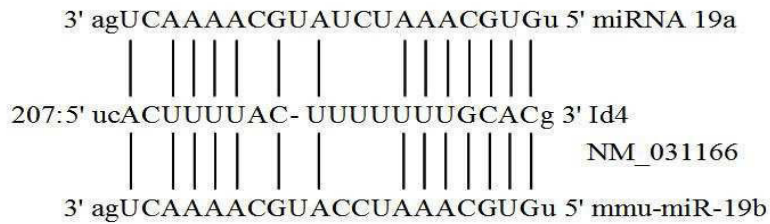


Abbildung 8: mögliche Bindungsstellen von miRNA 19a und miRNA 19b an Id4

Um herauszufinden, ob die miRNAs an diesen Bindungsstellen wirken können, wurde ein Luziferase Assay durchgeführt. Hierzu wurde ein Fragment aus der jeweiligen mRNA des Target-Proteins, welches die vorgesehene miRNA-Bindungsstelle enthielt, in einen psiCheck-2-Vektor kloniert. Danach wurden HEK293F-Zellen mit dem psiCHECK-2 Vektor transfiziert und die pre-miR miRNA die dort binden sollte hinzugefügt. In einem weiteren Ansatz wurde statt der spezifischen miRNA ein Mix verschiedener pre-miR miRNAs als Kontrolle hinzugefügt. Die Renilla- und Luziferaseaktivität wurde 24 Stunden später gemessen und die Daten wie bereits in den Methoden beschrieben ausgewertet. Je niedriger die Luziferase Aktivität, desto effektiver bindet die miRNA an der Target-mRNA des jeweiligen Proteins.

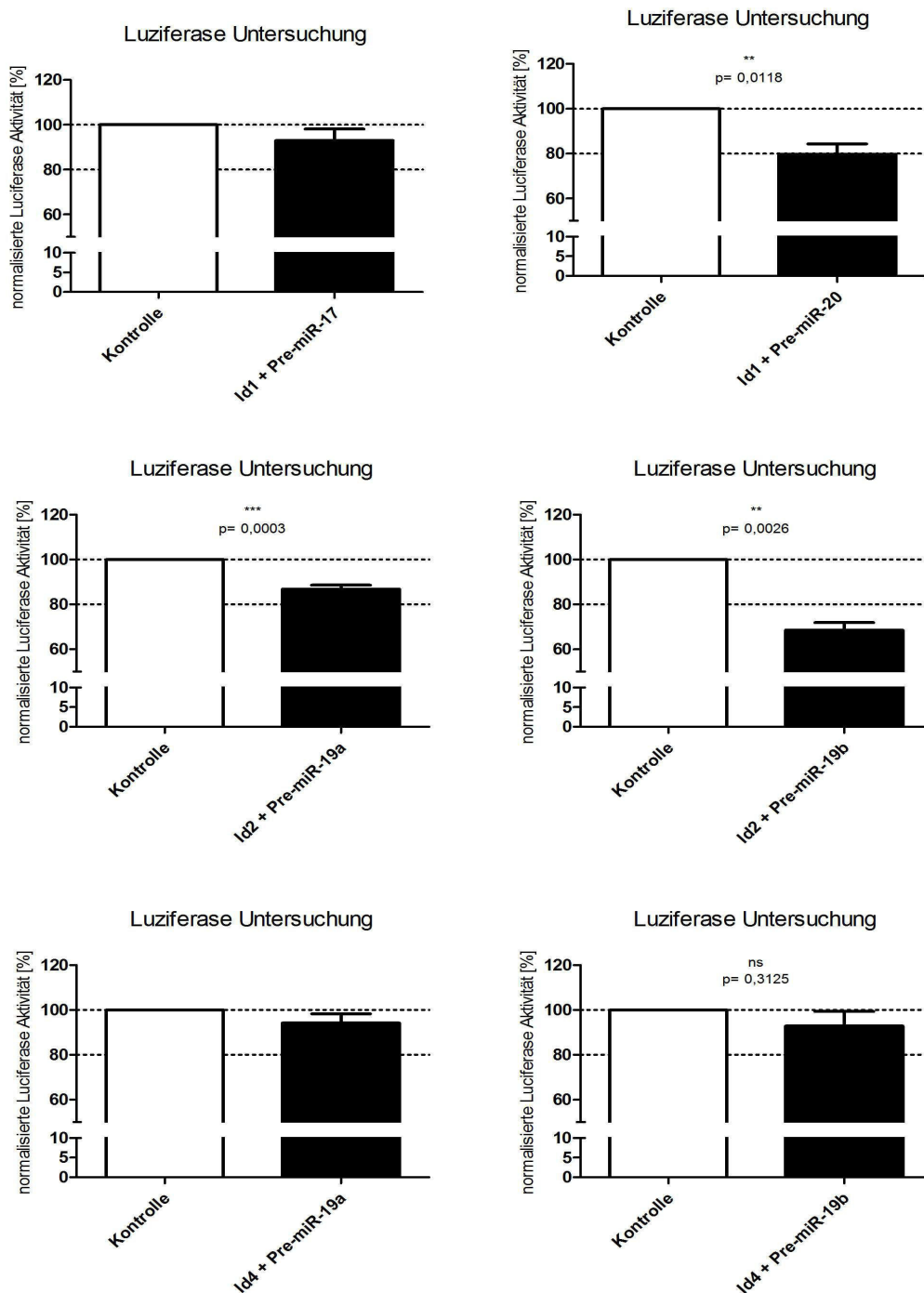


Abbildung 9: Luziferase Untersuchung, um Fähigkeit zur Bindung einzelner Mitglieder des miRNA 17-92 Clusters an verschiedenen Zielstellen der mRNA von Id-Proteinen zu überprüfen. Ein psiCheck2-Vektor mit den jeweiligen Bindungsstellen der Id-mRNAs wurde zusammen mit miRNA 17, miRNA 19a, miRNA 19b oder miRNA 20 oder einem miRNA-Kontroll-Mix in HEK293F-Zellen transfiziert und nach 24h die relative Luziferaseaktivität gemessen. Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler (n=4-7; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Es konnte eine signifikante Inhibition der mRNA von Id1 durch miRNA 20 sowie eine Hemmung von Id2 durch miRNA 19a und 19b festgestellt werden. Das lässt diese miRNAs auch *in vivo* zu potentiellen Regulatoren dieser Proteine werden.

3.6. Einfluss von miR19b auf pDCs in Flt3L-Kulturen

Die Abbildung 9 zeigt miRNA 19b die prozentual deutlichste Hemmung an Id2 in der Luziferase Untersuchung. Es wurde eine Flt3L-Kultur bis zum sechsten Tag wie bereits erläutert angesetzt, um zu überprüfen ob miRNA 19b einen Effekt auf die Maturation von pDCs ausüben kann. Zusätzlich wurden die Zellen jeden Tag mit miRNA 19b oder mit verschiedenen miRNAs zur Kontrolle transfiziert. In Abbildung 10 zeigt sich, dass die Transfektion keinen Einfluss auf die pDC-Entwicklung in den Wildtyp oder CKO Mäusen hatte. Lediglich die Reifung der pDCs war in den CKO Mäusen im Gegensatz zu den Bl-6 Mäusen leicht schwächer. Dieses Resultat steht im Einklang mit Li et al., welcher in GM-CSF-DC-Kulturen einen inhibierenden Effekt von Id2 auf die pDC-Bildung gefunden hat. (Li, Yang et al. 2012) Dieser Effekt von Id2 könnte auch von GM-CSF-DC-Kulturen auf hier verwendete Flt3L-DC-Kulturen übertragbar sein.

Obwohl es scheint, als ob miRNA 19b als einzelne miRNA keinen Einfluss auf die Maturation der Kultur nehmen kann, so kann sie in dieser doch involviert sein, da miRNAs, wie in der Einleitung bereits erwähnt, generell eine fine-tuning Rolle zugesprochen wird, derer sie auch eher im Kollektiv eines Clusters nachkommen können.

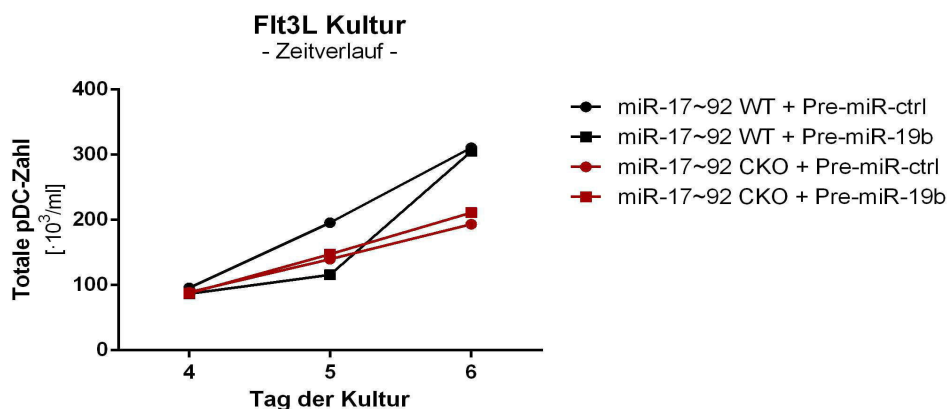


Abbildung 10: Zeitverlauf vierer Flt3L-Kultur dendritischer Zellen aus Wildtyp Mäusen und konditionellen Knock-out Mäusen, welche jeweils ein randomisiertes Gemisch verschiedener miRNAs oder spezifisch die miRNA 19b zugesetzt bekommen. An Tag vier, fünf und sechs wurden

die Zellzahlen der Kulturen bestimmt und in den Graph eingetragen. Zu Beginn wurde den Kulturen *mSCF* und *Flt3L* zugesetzt, sowie am zweiten, vierten und sechsten Tag nochmals *Flt3L* eingebracht. Es handelt sich um Einzelwerte, ohne statistische Aussagekraft.

3.7. Rt-qPCR von pDC-mRNA in miRNA 17-92 Knock-out Mäusen

Um den Einfluss des Clusters in dendritischen Zellen abschätzen zu können, wurden aus Knochenmarks-Kulturen von DCs aus B16-Mäusen (miR-17-92WT) und miRNA 17-92 CKO Mäusen (miR-17-92 Δ) mithilfe der RT-qPCR die mRNA Levels von *Id1*; *Id2*; *Id4*, *Siglec-H* und *E2-2* bestimmt. *Siglec-H* (Sialinsäure bindendes Immunglobulin-ähnliches Lektin H) ist als speziell auf pDCs Vorläuferzellen in Knochenmark, Milz, Blut und Lymphknoten vorkommender Rezeptor akzeptiert (Zhang, Raper et al. 2006). Er dient in diesem Versuch als Kontroll-pDC-mRNA. E-Proteine treten in der Regel als Aktivatoren der Transkription auf, können aber auch unterdrückend wirken (Kee 2009). Das E-Protein *E2-2* (auch *Tcf4* genannt) ist normalerweise stark in pDCs exprimiert und führt zu einer pDC-Entwicklung, hat jedoch keinen Einfluss auf cDCs (Cisse, Caton et al. 2008, Nagasawa, Schmidlin et al. 2008). Überexpression von *E2-2* führt zu einer vermehrten pDC-Bildung (Nagasawa, Schmidlin et al. 2008), wohingegen dessen Fehlen in pDCs zu spontaner Umwandlung in cDCs führt und *E2-2* durch *Id2* in cDCs supprimiert zu sein scheint (Ghosh, Cisse et al. 2010).

Es zeigt sich, dass alle mRNAs in den CKO Mäusen dieses Versuchsaufbaus häufiger vorkommen. Es könnte somit für jede dieser mRNAs eine direkte oder indirekte Hemmung durch das miRNA 17-92 Cluster in Frage kommen. Besonders auffällig ist eine erhöhte Expression von *Id2* und die im Vergleich zu *Siglec-H* nur bedingt erhöhte Expression von *E2-2*, sodass deren Vorkommen in einzelnen Organen näher untersucht wurde.

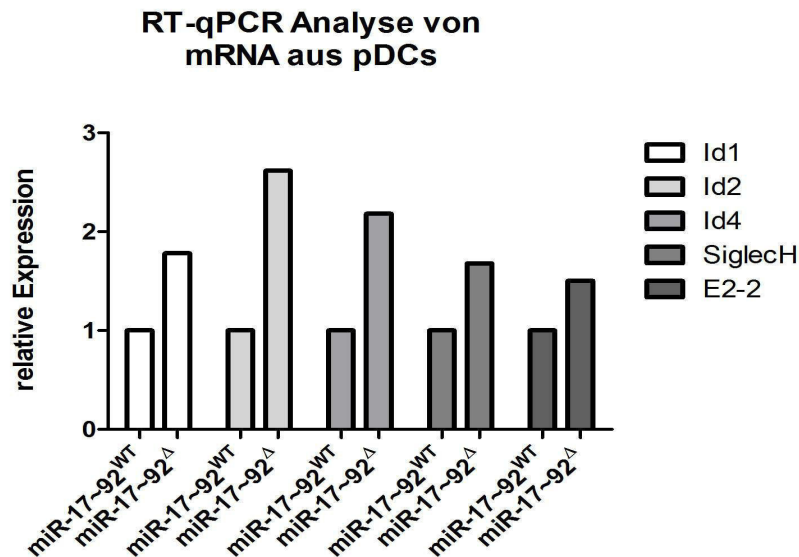


Abbildung 11: RT-qPCR Analyse von mRNAs aus pDC-Knochenmarks-Kulturen aus Bl6- oder miRNA 17-92 CKO Mäusen. Die mRNA wurde am siebten Kulturtag isoliert, in cDNA umgeschrieben und auf den absoluten Wert der mRNA im Wildtyp normalisiert. Die Grafik zeigt Einzelwerte, ohne statistische Relevanz

3.8. Id2 in Gewebe von miRNA 17-92 Knock-out Mäusen

Um zu untersuchen, ob und vor allem in welchen Organen sich die Id2 und E2-2 Expression durch das Ausschalten des miRNA 17-92 Clusters in CD11c⁺ Zellen ändert, wurden die Milz (SP) sowie die mesenterialen (LN mese), peripheren (LN peri) und paraaortalen (LN para) Lymphknoten von jeweils vier konditionellen Knock-out Mäusen und vier Bl-6 Mäusen entnommen. Die mRNA der Organe wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und daraufhin eine qPCR durchgeführt.

In der Milz und den peripheren Lymphknoten kommt es zu einer leichten Zunahme der E2-2 Expression. In paraaortalen Lymphknoten ist Id2 und E2-2 in CKO Mäusen leicht verringert. Id2 ist in den peripheren Lymphknoten erhöht und in der Milz unverändert. Eine signifikante Abnahme konnte nur in mesenterialen Lymphknoten für Id2 als auch E2-2 in CKO Mäusen gefunden werden. Es zeigt sich, dass das Fehlen des miRNA 17-92 Clusters in CD11c⁺ Zellen Einflüsse auf die Expression von Id2 und E2-2 in Lymphknoten und der Milz haben könnte. Auch hier ist die Expression von Id2 und E2-2 auf das ganze Organ bezogen. Das Fehlen des Clusters in CD11c⁺ Zellen könnte auch indirekt in anderen Zellen die Id2 und E2-2 Expression verändern,

weshalb es noch genauerer Analysen bedarf.

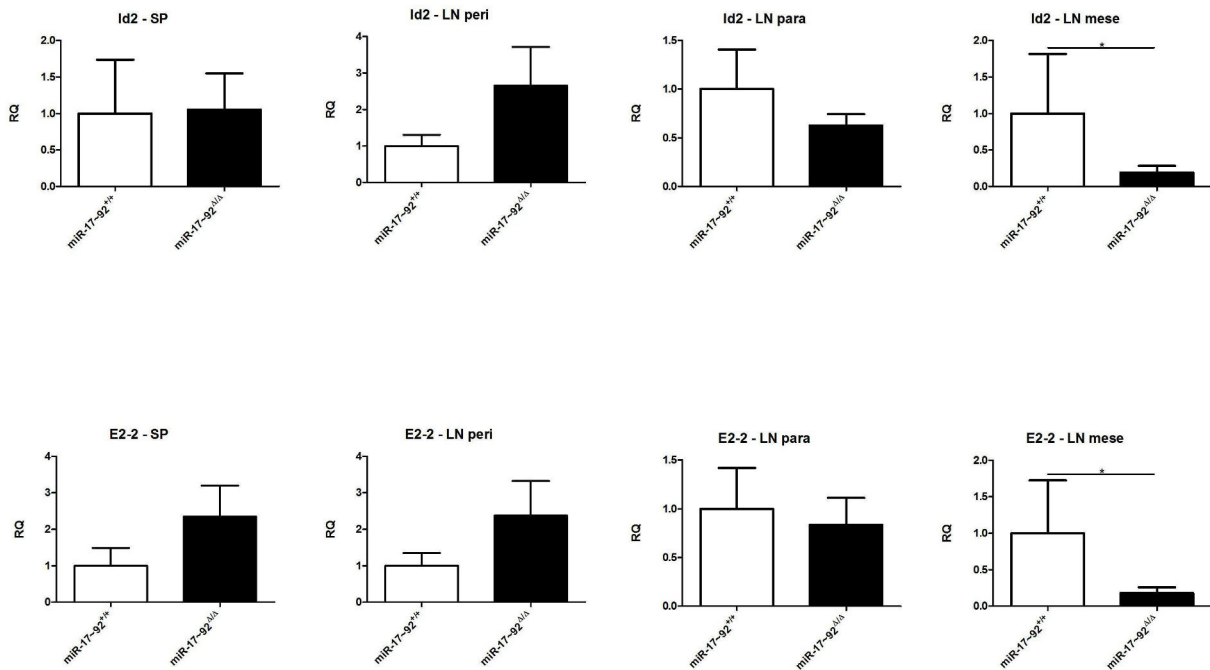


Abbildung 12 zeigt die relative Häufigkeit von Id2 oder E2-2 mRNA in Organen von vier Bl-6 und vier miRNA 17-92 CKO Mäusen. Dazu wurden den sechs bis acht Wochen alten Tieren die jeweiligen Organe entnommen, die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mithilfe einer RT-PCR die relative Menge der einzelnen mRNAs bestimmt, wobei der niedrigste Wert als Norm verwendet wurde. (n=3-4; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

4. Diskussion

4.1. Das Micro-RNA 17-92 Cluster in der DC-Maturation

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Mitglieder des miRNA 17-92 Clusters Id1 und Id2 in einem Luziferase Assay signifikant inhibieren. Ferner ist deren mRNA in Mäusen, welchen in CD11c⁺ das miRNA 17-92 Cluster fehlt, tendenziell häufiger vorhanden. In mesenterialen Lymphknoten konnten ebenfalls ein Trend hin zu einer erhöhten Expression gefunden werden.

In den *in vitro*-DC-Kulturen waren auffällige Schwankungen in der Expression des Clusters sowie der cDC/pDC-Zellzahlen ersichtlich. Sollten sich diese durch weitere Tests bestätigen, stützt dies die These, dass dieses Cluster während der DC-Reifung oder DC-Phänotypveränderungen eine Rolle spielen könnte.

Zuerst wurde angenommen, dass ein Fehlen des Clusters über eine erhöhte Id2-Expression zu einer Abnahme von E2-2 führen müsste, da Id2 und E2-2, sowie dessen Transkriptionsfaktor Spi-B, sich gegenseitig hemmen (Ghosh, Cisse et al. 2010, Nagasawa, Schmidlin et al. 2008). Allerdings besitzt auch das murine E2-2 zwei Bindungsstellen an denen mit miRNA 17 und miRNA 20 Mitglieder des miRNA 17-92 Clusters binden können.

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Expression von Id2 und E2-2 durch die Signaltransduzierenden Proteine STAT3 und STAT5 in der DC-Entwicklung kontrolliert werden (Li, Yang et al. 2012). Dabei induziert STAT5 eine Id2-Expression und STAT3 den Gegenspieler E2-2. Die Tatsache, dass auch STAT 3 zwei Bindungsstellen für miRNA 17 und 20 hat und STAT5 eine Bindungsstelle für miRNA 19a und 19b besitzt, lässt die Vermutung aufkommen, dass das miRNA 17-92 Cluster als *Feedback Loop* diesen Vorgang reguliert. Für STAT3 ist eine Regulation des miRNA 17-92 Clusters in Hepatozyten bereits nachgewiesen (Brock, Trenkmann et al. 2011), und könnte somit auch in DCs eine Rolle spielen.

Sicherlich bedarf es dafür noch weiterer Studien, um zu überprüfen, ob die vorhandenen Bindungsstellen auch zu einer effektiven Repression der Translation dieser Proteine führen. Über diese Hypothese könnte sich auch erklären, warum in Flt3L-DC-Kulturen, denen das miRNA 17-92 Cluster fehlt, keine signifikanten Zellzahl-Unterschiede festzustellen waren.

Sollte das miRNA 17-92 Cluster wie vermutet über eine Unterdrückung von Agonisten und Antagonisten die DC-Maturation oder DC-Phänotypveränderungen fein abstimmen, stellt sich die

Frage der Funktion dieser zusätzlichen Regulationsebene. So könnte dadurch eine Feinabstimmung der Teilung der Population in cDCs und pDCs erzielt werden.

In der Atherosklerose wird die Anwesenheit von unreifen DCs über Rekrutierung aus der Blutbahn mithilfe von Rezeptoren sowie deren Differenzierung aus Monozyten nach heutigem Wissenstand erklärt (Fogg, Sibon et al. 2006, Liu, Victora et al. 2009, Zernecke, Shagdarsuren et al. 2008). Ein Anstieg der DC-Zahlen während dem Verlauf der Krankheit könnten noch durch vermehrte Rekrutierung aus der Blutbahn und Differenzierung aus Monozyten, sowie deren Proliferation interpretiert werden. Für das breite Spektrum an verschiedenen DC-Subtypen in atherosklerotischen Läsionen müssen allerdings noch unentdeckte Enddifferenzierungsmechanismen oder Rekrutierungswege vorhanden sein. Erste Übersichtsarbeiten, welche die Subtypen klassifizieren und über deren Herkunft spekulieren existieren bereits (Busch, Westhofen et al. 2014, Choi, Do et al. 2009). Sowohl bei Entdifferenzierungsmechanismen, als auch bei DC-Reifungsprozessen in der Atherosklerose würde sich das miRNA 17-92 Cluster aufgrund seiner vielen potentiellen Bindungsstellen an mRNAs von regulatorischen Proteinen als Feinregulator eignen.

In dieser Rolle entscheidend auftreten könnte das Cluster in mo-DCs. Diese entstehen nach allgemeiner Auffassung bei GM-CSF Einwirkung unter inflammatorischen Bedingungen in der Atherosklerose. In GM-CSF-DC-Kulturen konnte durch Il-6 Zugabe ein erhöhtes miRNA 17-92 Profil nachgewiesen werden (Brock, Trenkmann et al. 2009). *In vivo*, unter physiologischen Bedingungen, sind in den CD11c miRNA 17-92 CKO Mäusen keine Unterschiede der Zellzahlen von cDCs im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen gefunden worden (Zernecke et al., unpubliziert). In dieser Promotion aus unserer Arbeitsgruppe konnte ferner in *Ldlr*^{-/-} CD11c miRNA 17-92 CKO Mäusen nach fünf Wochen mehr atherosklerotischer Plaque als in *Ldlr*^{-/-} Vergleichstieren gefunden werden. Dies kann auf eine fehlende Wirkung des Clusters in mo-DCs zurückzuführen sein und könnte eine mögliche antiinflammatorische Wirkung des Clusters zeigen (Zernecke et al., unpubliziert).

Allerdings beziehen sich diese Daten weniger auf pDCs, in welchen die Expression des Clusters von Kuipers et al. erhöht vorgefunden wurde, obwohl sich die Arbeit eigentlich auf miRNA 221 und 222 konzentriert (Kuipers, Schnorfeil et al. 2010).

4.2. Das Micro-RNA 17-92 Cluster in pDCs

Das Cluster als Feinregulator von DC-Maturation und DC-Subtypen in der Atherosklerose ist eine Hypothese. Es könnte auch ausschließlich eine Rolle in pDCs spielen. Hierbei ist an eine Förderung der pDC-Entwicklung oder Wirkung auf pDC-Funktionen zu denken. Die potentiellen Bindungsstellen des Clusters an E2-2 müssten somit entweder über eine Luziferase Untersuchung als *in vivo* Bindungsstellen auszuschließen sein oder dienen lediglich als negative Rückkopplung, da E2-2 als pDC-fördernd angesehen wird (Nagasawa, Schmidlin et al. 2008). STAT3 konnte in zahlreichen Untersuchungen als wichtiger DC-Differenzierungsfaktor ermittelt werden. Fehlt Mäusen STAT3, so besitzen sie ähnlich geringe DC-Zahlen wie ohne Flt3L, welche auch durch zusätzliche Injektion von Flt3L oder LPS- induzierte Inflammation nicht ansteigen (Laouar, Welte et al. 2003). Dabei greift STAT3 erst nach Flt3L in der Entdifferenzierung über transkriptionelle Aktivierung verschiedene Faktoren ein (Onai, Obata-Onai et al. 2006, Zenke und Hieronymus 2006). In Hepatozyten konnte der seltene Fall beobachtet werden, dass miRNA 18 die Transkription von STAT3 mRNA erhöht (Brock, Trenkmann et al. 2009). Wäre dies auch in DCs der Fall, so wird in Abbildung 2 und 3 deutlich, dass an Tag fünf der Flt3L-Kultur ein Peak der meisten miRNAs des Clusters zu einer vermehrten Zellproliferation und anschließend zu einem pDC-'Shift' ab Tag sechs geführt haben könnte. Dieser einmalige Versuchsaufbau bedarf allerdings weiterer Wiederholungen, um das Ergebnis zu bestätigen. Da die Rolle von pDCs in der Atherosklerose heute als zunehmend proinflammatorisch angesehen wird (Doring und Zernecke 2012), steht diese These in relativem Widerspruch zur vermehrten Plaquebildung bei Fehlen des Clusters in CD11c⁺ Zellen von Mäusen (Zernecke et al., unpubliziert).

Es gibt jedoch auch mögliche Ansatzpunkte, wie das miRNA 17-92 Cluster ebenfalls die Funktion von pDCs beeinflussen könnte. STAT3 wird dabei eine dämpfende Wirkung auf die IFN- α/β Synthese zugeschrieben: Zum einen durch Hemmung der STAT1 Genaktivierung und zum anderen als Transkriptionsfaktor der Interferone (Ho und Ivashkiv 2006). Zellen, welchen STAT3 fehlt, zeigten eine erhöhte Genexpression und antivirale Aktivität wenn sie IFN- α/β ausgesetzt waren (Wang, Levy et al. 2011). Da STAT3 neben STAT1/2, welche die IFN- α/β Synthese unterstützen, bei IFN- α/β Exposition ausgeschüttet wird, geht man von einer negativen Rückkopplungsfunktion von STAT3 aus (Wang, Levy et al. 2011). Ließe sich die Aktivierung von STAT3 durch miRNA 18 in Hepatozyten (Brock, Trenkmann et al. 2011) nun auch in dendritischen Zellen nachweisen, so wäre dies ein weiterer Faktor, der eine antiinflammatorische

Wirkung des miRNA 17-92 Clusters in der Atherosklerose unterstützen würde.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt kann es durchaus sein, dass einzelne miRNAs des Clusters singular betrachtet keinen signifikanten Einfluss auf die Expression eines einzelnen Proteins, welches die Reifung oder die Funktion in pDCs begünstigt, haben. Das miRNA 17-92 Cluster könnte allerdings in der Summe einen signifikanten Effekt auslösen. Es bedarf nun weiterer Studien zum miRNA 17-92 Cluster, die sich speziell auf die pDC-Maturation und -Funktionen *in vivo* beziehen oder eventuelle Störungen von pDCs, beispielsweise bei der IFN- α Sekretion, untersuchen.

Zum weiteren Verständnis von dendritischen Zellen, sowie der Funktion des miRNA 17-92 Clusters in DCs, müssen DC-Subtypen in atherosklerotischen Läsionen noch präziser voneinander und von anderen Zelltypen abgrenzbar sein. Mit *Zbtb64* scheint ein Transkriptionsfaktor gefunden, der exklusiv bei cDCs vorkommt (Meredith, Liu et al. 2012, Satpathy, Kc et al. 2012). Dies ermöglicht unter Umständen auch eine genauere Betrachtung der Funktionen des miRNA 17-92 Clusters in diesen Zellen und gibt Hoffnung auch für weitere DC-Subtypen exklusive Abgrenzungsmerkmale finden zu können.

5. Zusammenfassung

Atherosklerose ist eine chronisch-entzündliche Gefäßkrankung. Dabei sind alle entscheidenden Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems involviert. Besonders dendritische Zellen (DCs) expandieren subendothelial während der Progression einer Atherosklerose. Diese können Antigene aufnehmen und daraufhin Zytokine produzieren oder andere Immunzellen aktivieren. MicroRNAs (miRNAs) sind kleine nicht-kodierende Stränge aus Ribonukleinsäure, welche als weitere Ebene der Genregulation wichtige Zellvorgänge beeinflussen können. Diese Arbeit zeigt mögliche Zielproteine des miRNA 17-92 Clusters in dendritischen Zellen auf und schlägt mögliche Modelle vor, wie dadurch Zellvorgänge von DCs in der Atherosklerose reguliert werden könnten.

6. Literaturverzeichnis

Ait-Oufella, H., et al. (2006). "Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice." Nat Med **12**(2): 178-180.

Alderman, C. J., et al. (2002). "Effects of oxidised low density lipoprotein on dendritic cells: a possible immunoregulatory component of the atherogenic micro-environment?" Cardiovasc Res **55**(4): 806-819.

Alvarez, D., et al. (2008). "Mechanisms and consequences of dendritic cell migration." Immunity **29**(3): 325-342.

Arinobu, Y., et al. (2007). "Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages." Cell Stem Cell **1**(4): 416-427.

Arnold, L., et al. (2007). "Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis." J Exp Med **204**(5): 1057-1069.

Arroyo, J. D., et al. (2011). "Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(12): 5003-5008.

Auffray, C., et al. (2009). "CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation." J Exp Med **206**(3): 595-606.

Bachetoni, A., et al. (2002). "Diltiazem impairs maturation and functions of human dendritic cells." Hum Immunol **63**(7): 524-533.

Baek, D., et al. (2008). "The impact of microRNAs on protein output." Nature **455**(7209): 64-71.

Barik, S. (2008). "An intronic microRNA silences genes that are functionally antagonistic to its host gene." Nucleic Acids Res **36**(16): 5232-5241.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.

Belz, G. T. and S. L. Nutt (2012). "Transcriptional programming of the dendritic cell network." Nat Rev Immunol **12**(2): 101-113.

Bennett, C. L., et al. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**(1): 20-21.

Bernstein, E., et al. (2003). "Dicer is essential for mouse development." Nat Genet **35**(3): 215-217.

Betel, D., et al. (2010). "Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non conserved and non-canonical sites." Genome Biol **11**(8): R90.

Bobryshev, Y. V. and R. S. Lord (1995). "S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions." Cardiovasc Res **29**(5): 689-696.

Bobryshev, Y. V., et al. (1996). "VCAM-1 expression and network of VCAM-1 positive vascular dendritic cells in advanced atherosclerotic lesions of carotid arteries and aortas." Acta Histochem **98**(2): 185-194.

Bogunovic, M., et al. (2009). "Origin of the lamina propria dendritic cell network." Immunity **31**(3): 513-525.

Bonauer, A., et al. (2009). "MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice." Science **324**(5935): 1710-1713.

Boulesteix, T., et al. (2006). "Micrometer scale ex vivo multiphoton imaging of unstained arterial wall structure." Cytometry A **69**(1): 20-26.

Branen, L., et al. (2004). "Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(11): 2137-2142.

Brasel, K., et al. (2000). "Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures." Blood **96**(9): 3029-3039.

Brawand, P., et al. (2002). "Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs." J Immunol **169**(12): 6711-6719.

Breathnach, A. S., et al. (1968). "Langerhans cells in mouse skin experimentally deprived of its neural crest component." J Invest Dermatol **50**(2): 147-160.

Brock, M., et al. (2011). "MicroRNA-18a enhances the interleukin-6-mediated production of the acute-phase proteins fibrinogen and haptoglobin in human hepatocytes." J Biol Chem **286**(46): 40142-40150.

Brock, M., et al. (2009). "Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway." Circ Res **104**(10): 1184-1191.

Brunkow, M. E., et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.

Bryniarski, K., et al. (2013). "Antigen-specific, antibody-coated, exosome-like nanovesicles deliver suppressor T-cell microRNA-150 to effector T cells to inhibit contact sensitivity." J Allergy Clin Immunol **132**(1): 170-181.

Buono, C., et al. (2004). "B7-1/B7-2 costimulation regulates plaque antigen-specific T-cell responses and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice." Circulation **109**(16): 2009-2015.

Busch, M. and A. Zerneck (2012). "microRNAs in the regulation of dendritic cell functions in inflammation and atherosclerosis." J Mol Med (Berl) **90**(8): 877-885.

Busch, M., et al. (2014). "Dendritic cell subset distributions in the aorta in healthy and atherosclerotic mice." PLoS One **9**(2): e88452.

Caligiuri, G., et al. (2002). "Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice." J Clin Invest **109**(6): 745-753.

Ceppi, M., et al. (2009). "MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2735-2740.

Chapoval, A. I., et al. (2001). "B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production." Nat Immunol **2**(3): 269-274.

Chemnitz, J. M., et al. (2004). "SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation." J Immunol **173**(2): 945-954.

Chen, C. Z., et al. (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." Science **303**(5654): 83-86.

Chen, J. F., et al. (2008). "Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 2111-2116.

Choi, J. H., et al. (2009). "Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves." J Exp Med **206**(3): 497-505.

Choi, J. H., et al. (2011). "Flt3 signaling-dependent dendritic cells protect against atherosclerosis." Immunity **35**(5): 819-831.

Choi, W. Y., et al. (2007). "Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430." Science **318**(5848): 271-274.

Cisse, B., et al. (2008). "Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development." Cell **135**(1): 37-48.

Combadiere, C., et al. (2003). "Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice." Circulation **107**(7): 1009-1016.

- Combadiere, C., et al. (2008). "Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytes and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice." Circulation **117**(13): 1649-1657.
- Concepcion, C. P., et al. (2012). "The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease." Cancer J **18**(3): 262-267.
- Coombes, J. L., et al. (2007). "A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism." J Exp Med **204**(8): 1757-1764.
- Dahlof, B. (2010). "Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment." Am J Cardiol **105**(1 Suppl): 3A-9A.
- Daissormont, I. T., et al. (2011). "Plasmacytoid dendritic cells protect against atherosclerosis by tuning T-cell proliferation and activity." Circ Res **109**(12): 1387-1395.
- Daro, E., et al. (2000). "Polyethylene glycol-modified GM-CSF expands CD11b(high)CD11c(high) but not CD11b(low)CD11c(high) murine dendritic cells in vivo: a comparative analysis with Flt3 ligand." J Immunol **165**(1): 49-58.
- Davenport, P. and P. G. Tipping (2003). "The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Am J Pathol **163**(3): 1117-1125.
- de Boer, O. J., et al. (2007). "Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions." PLoS One **2**(8): e779.
- de Kouchkovsky, D., et al. (2013). "microRNA-17-92 regulates IL-10 production by regulatory T cells and control of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **191**(4): 1594-1605.
- de Pontual, L., et al. (2011). "Germline deletion of the miR-17 approximately 92 cluster causes skeletal and growth defects in humans." Nat Genet **43**(10): 1026-1030.

DePaolo, R. W., et al. (2011). "Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens." Nature **471**(7337): 220-224.

Diehl, P., et al. (2012). "Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation." Cardiovasc Res **93**(4): 633-644.

Diesselhoff-den Dulk, M. M., et al. (1979). "Origin and kinetics of Kupffer cells during an acute inflammatory response." Immunology **37**(1): 7-14.

Djuranovic, S., et al. (2011). "A parsimonious model for gene regulation by miRNAs." Science **331**(6017): 550-553.

Dominguez, P. M. and C. Ardavin (2010). "Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation." Immunol Rev **234**(1): 90-104.

Dong, C., et al. (2001). "Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions." J Immunol **166**(6): 3659-3662.

Doring, Y. and A. Zernecke (2012). "Plasmacytoid dendritic cells in atherosclerosis." Front Physiol **3**: 230.

Dunand-Sauthier, I., et al. (2011). "Silencing of c-Fos expression by microRNA-155 is critical for dendritic cell maturation and function." Blood **117**(17): 4490-4500.

El Gazzar, M., et al. (2011). "MicroRNA-146a regulates both transcription silencing and translation disruption of TNF-alpha during TLR4-induced gene reprogramming." J Leukoc Biol **90**(3): 509-519.

El Gazzar, M. and C. E. McCall (2012). "MicroRNAs regulatory networks in myeloid lineage development and differentiation: regulators of the regulators." Immunol Cell Biol **90**(6): 587-593.

Eliason, J. L., et al. (2005). "Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation." Circulation **112**(2): 232-240.

Engel, D., et al. (2006). "Tumor necrosis factor alpha- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells are rapidly recruited to the bladder in urinary tract infection but are dispensable for bacterial clearance." Infect Immun **74**(11): 6100-6107.

Erbel, C., et al. (2007). "Functional profile of activated dendritic cells in unstable atherosclerotic plaque." Basic Res Cardiol **102**(2): 123-132.

Erbel, C., et al. (2009). "Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice." J Immunol **183**(12): 8167-8175.

Fancke, B., et al. (2008). "M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin." Blood **111**(1): 150-159.

Flies, D. B. and L. Chen (2007). "The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity." J Immunother **30**(3): 251-260.

Fogg, D. K., et al. (2006). "A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells." Science **311**(5757): 83-87.

Fontana, L., et al. (2007). "MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation." Nat Cell Biol **9**(7): 775-787.

Fontenot, J. D., et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-336.

Freeman, G. J., et al. (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." J Exp Med **192**(7): 1027-1034.

Frostegard, J. (2010). "Rheumatic diseases: insights into inflammation and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(5): 892-893.

Gautier, E. L., et al. (2009). "Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity

and cholesterol homeostasis in atherosclerosis." Circulation **119**(17): 2367-2375.

Geissmann, F., et al. (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.

Geneva: World Health Organization; 2007. Prevention of cardiovascular disease: Guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk.

Geneva: World Health Organization; 2008. Causes of death.

Ghosh, H. S., et al. (2010). "Continuous expression of the transcription factor e2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells." Immunity **33**(6): 905-916.

Gilad, S., et al. (2008). "Serum microRNAs are promising novel biomarkers." PLoS One **3**(9): e3148.

Gilliet, M., et al. (2002). "The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." J Exp Med **195**(7): 953-958.

Ginhoux, F., et al. (2009). "The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs." J Exp Med **206**(13): 3115-3130.

Gong, A. Y., et al. (2009). "MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN-gamma-induced B7-H1 expression in cholangiocytes." J Immunol **182**(3): 1325-1333.

Goossens, P., et al. (2010). "Myeloid type I interferon signaling promotes atherosclerosis by stimulating macrophage recruitment to lesions." Cell Metab **12**(2): 142-153.

Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.

Gotsman, I., et al. (2007). "Proatherogenic immune responses are regulated by the PD-1/PD-L pathway in mice." J Clin Invest **117**(10): 2974-2982.

Gotsman, I., et al. (2006). "Impaired regulatory T-cell response and enhanced atherosclerosis in the absence of inducible costimulatory molecule." Circulation **114**(19): 2047-2055.

Greenland, P., et al. (2010). "2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." J Am Coll Cardiol **56**(25): e50-103.

Griffiths-Jones, S., et al. (2005). "Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D121-124.

Hacker, C., et al. (2003). "Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development." Nat Immunol **4**(4): 380-386.

Hall, J. A., et al. (2011). "Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4(+) T cell effector responses via retinoic acid receptor alpha." Immunity **34**(3): 435-447.

Hamilton, J. A. (2008). "Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity." Nat Rev Immunol **8**(7): 533-544.

Han, J., et al. (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex." Cell **125**(5): 887-901.

Hansson, G. K. and A. Hermansson (2011). "The immune system in atherosclerosis." Nat Immunol **12**(3): 204-212.

Harris, T. A., et al. (2008). "MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(5): 1516-1521.

Hashimi, S. T., et al. (2009). "MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation." Blood **114**(2): 404-414.

He, L., et al. (2005). "A microRNA polycistron as a potential human oncogene." Nature

435(7043): 828-833.

Hermansson, A., et al. (2010). "Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis." J Exp Med **207**(5): 1081-1093.

Ho, H. H. and L. B. Ivashkiv (2006). "Role of STAT3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation." J Biol Chem **281**(20): 14111-14118.

Hobo, W., et al. (2010). "siRNA silencing of PD-L1 and PD-L2 on dendritic cells augments expansion and function of minor histocompatibility antigen-specific CD8+ T cells." Blood **116**(22): 4501-4511.

Hochweller, K., et al. (2008). "A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells." Eur J Immunol **38**(10): 2776-2783.

Hori, S., et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.

Hou, J., et al. (2009). "MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2." J Immunol **183**(3): 2150-2158.

Huber, S. A., et al. (2001). "T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia." Circulation **103**(21): 2610-2616.

Hume, D. A. (2008). "Macrophages as APC and the dendritic cell myth." J Immunol **181**(9): 5829-5835.

Hunter, M. P., et al. (2008). "Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles." PLoS One **3**(11): e3694.

Huntzinger, E. and E. Izaurralde (2011). "Gene silencing by microRNAs: contributions of

translational repression and mRNA decay." Nat Rev Genet **12**(2): 99-110.

Hutvagner, G., et al. (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-838.

Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." Science **297**(5589): 2056-2060.

Inaba, K., et al. (1992). "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." J Exp Med **176**(6): 1693-1702.

Inomata, M., et al. (2009). "MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes." Blood **113**(2): 396-402.

James, V., et al. (2010). "LIM-domain proteins, LIMD1, Ajuba, and WTIP are required for microRNA-mediated gene silencing." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(28): 12499-12504.

Ji, R., et al. (2007). "MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation." Circ Res **100**(11): 1579-1588.

Jonasson L., Holm J., Skalli O., Bondjers G., Hansson G-K. "Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque." Arteriosclerosis (1986) **6**(2):131–8. doi:10.1161/01.ATV.6.2.131

Jongstra-Bilen, J., et al. (2006). "Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis." J Exp Med **203**(9): 2073-2083.

Jurkin, J., et al. (2010). "miR-146a is differentially expressed by myeloid dendritic cell subsets and desensitizes cells to TLR2-dependent activation." J Immunol **184**(9): 4955-4965.

Kabashima, K., et al. (2005). "Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells." Immunity **22**(4): 439-450.

Karrich, J. J., et al. (2013). "MicroRNA-146a regulates survival and maturation of human plasmacytoid dendritic cells." Blood **122**(17): 3001-3009.

Kastelein, R. A., et al. (2007). "Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation." Annu Rev Immunol **25**: 221-242.

Kee, B. L. (2009). "E and ID proteins branch out." Nat Rev Immunol **9**(3): 175-184.

Ketting, R. F., et al. (2001). "Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*." Genes Dev **15**(20): 2654-2659.

Khan, A. A., et al. (2013). "MicroRNA-17~92 regulates effector and memory CD8 T-cell fates by modulating proliferation in response to infections." Blood **121**(22): 4473-4483.

Khoo, J. C., et al. (1988). "Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self aggregation." Arteriosclerosis **8**(4): 348-358.

Khoo, J. C., et al. (1992). "Monoclonal antibodies against LDL further enhance macrophage uptake of LDL aggregates." Arterioscler Thromb **12**(11): 1258-1266.

Khattari, R., et al. (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." Nat Immunol **4**(4): 337-342.

King, I. L., et al. (2009). "Circulating Ly-6C+ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease." Blood **113**(14): 3190-3197.

King, V. L., et al. (2002). "Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor-/- mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(3): 456-461.

Kingston, D., et al. (2009). "The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis." Blood **114**(4): 835-843.

Kofler, S., et al. (2008). "Dual mode of HMG-CoA reductase inhibition on dendritic cell invasion." Atherosclerosis **197**(1): 105-110.

Kohyama, M., et al. (2004). "Inducible costimulator-dependent IL-10 production by regulatory T cells specific for self-antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4192-4197.

Koltsova, E. K. and K. Ley (2011). "How dendritic cells shape atherosclerosis." Trends Immunol **32**(11): 540-547.

Kuehbachner, A., et al. (2007). "Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis." Circ Res **101**(1): 59-68.

Kuipers, H., et al. (2010). "Differentially expressed microRNAs regulate plasmacytoid vs. conventional dendritic cell development." Mol Immunol **48**(1-3): 333-340.

Kunjathoor, V. V., et al. (2002). "Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages." J Biol Chem **277**(51): 49982-49988.

Kyaw, T., et al. (2010). "Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis." J Immunol **185**(7): 4410-4419.

Lachmann, N., et al. (2012). "MicroRNA-150-regulated vectors allow lymphocyte-sparing transgene expression in hematopoietic gene therapy." Gene Ther **19**(9): 915-924.

Lagos-Quintana, M., et al. (2003). "New microRNAs from mouse and human." RNA **9**(2): 175-179.

Langer, H. F., et al. (2007). "Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(6): 1463-1470.

Langerhans, P. (1868). "Über die Nerven der menschlichen Haut." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **44**: 325-337.

Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2011). "Ralph M. Steinman 1943-2011." Cell **147**(6): 1216-1217.

Laouar, Y., et al. (2003). "STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation." Immunity **19**(6): 903-912.

Latchman, Y., et al. (2001). "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation." Nat Immunol **2**(3): 261-268.

Lee, T. S., et al. (1999). "The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(3): 734-742.

Lee, Y., et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.

Lee, Y., et al. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." EMBO J **21**(17): 4663-4670.

Lee, Y., et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **23**(20): 4051-4060.

Lewis, B. P., et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.

Li, H. S., et al. (2012). "The signal transducers STAT5 and STAT3 control expression of Id2 and E2-2 during dendritic cell development." Blood **120**(22): 4363-4373.

Li, J., et al. (2013). "Microvesicle-mediated transfer of microRNA-150 from monocytes to endothelial cells promotes angiogenesis." J Biol Chem **288**(32): 23586-23596.

Li, M. O. and R. A. Flavell (2008). "TGF-beta: a master of all T cell trades." Cell **134**(3): 392-404.

Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-874.

- Libby, P., et al. (2009). "Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice." J Am Coll Cardiol **54**(23): 2129-2138.
- Lim, L. P., et al. (2003). "Vertebrate microRNA genes." Science **299**(5612): 1540.
- Liu, C., et al. (2013). "Id1 expression promotes peripheral CD4+ T cell proliferation and survival upon TCR activation without co-stimulation." Biochem Biophys Res Commun **436**(1): 47-52.
- Liu, K. and M. C. Nussenzweig (2010). "Development and homeostasis of dendritic cells." Eur J Immunol **40**(8): 2099-2102.
- Liu, K., et al. (2009). "In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis." Science **324**(5925): 392-397.
- Liu, P., et al. (2008). "CX3CR1 deficiency impairs dendritic cell accumulation in arterial intima and reduces atherosclerotic burden." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(2): 243-250.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Llodra, J., et al. (2004). "Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(32): 11779-11784.
- Lloyd-Jones, D.M. (2010). "Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions." Circulation **121**(15), 1768-1777.
- Loke, P. and J. P. Allison (2003). "PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5336-5341.
- Lu, C., et al. (2011). "miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1, and SOCS-1." Blood **117**(16): 4293-4303.

Ludewig, B., et al. (2000). "Linking immune-mediated arterial inflammation and cholesterol-induced atherosclerosis in a transgenic mouse model." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12752-12757.

Lund, E., et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-98.

Lutter, D., et al. (2010). "Intronic microRNAs support their host genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects." BMC Genomics **11**: 224.

Lyszkiewicz, M., et al. (2011). "Chemokine receptor CX3CR1 promotes dendritic cell development under steady-state conditions." Eur J Immunol **41**(5): 1256-1265.

Ma-Krupa, W., et al. (2004). "Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis." J Exp Med **199**(2): 173-183.

Mahnke, K., et al. (2007). "Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation." Eur J Immunol **37**(8): 2117-2126.

Major, A. S., et al. (2002). "B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(11): 1892-1898.

Mallat, Z., et al. (2007). "Regulatory T-cell immunity in atherosclerosis." Trends Cardiovasc Med **17**(4): 113-118.

Mancino, A., et al. (2008). "Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions." Blood **112**(9): 3723-3734.

Mantovani, A., et al. (2009). "Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(10): 1419-1423.

Manz, M. G., et al. (2001). "Dendritic cell development from common myeloid progenitors." Ann N Y Acad Sci **938**: 167-173; discussion 173-164.

Maraskovsky, E., et al. (1996). "Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified." J Exp Med **184**(5): 1953-1962.

Martin, M. M., et al. (2006). "MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts." J Biol Chem **281**(27): 18277-18284.

Mayerl, C., et al. (2006). "Atherosclerosis research from past to present--on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow." Virchows Arch **449**(1): 96-103.

McKenna, H. J., et al. (2000). "Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells." Blood **95**(11): 3489-3497.

Meier, A., et al. (2008). "Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands." AIDS **22**(5): 655-658.

Mendis S, Puska P, Norrving B, editors. Geneva: World Health Organization; 2011. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control.

Meredith, M. M., et al. (2012). "Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage." J Exp Med **209**(6): 1153-1165.

Mi, Q. S., et al. (2012). "Lack of microRNA miR-150 reduces the capacity of epidermal Langerhans cell cross-presentation." Exp Dermatol **21**(11): 876-877.

Miller, A. M., et al. (2008). "IL-33 reduces the development of atherosclerosis." J Exp Med **205**(2): 339-346.

Miller, Y. I., et al. (2011). "Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity." Circ Res **108**(2): 235-248.

Millonig, G., et al. (2001). "Network of vascular-associated dendritic cells in intima of healthy

young individuals." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(4): 503-508.

Miloud, T., et al. (2010). "Review of murine dendritic cells: types, location, and development." Methods Mol Biol **595**: 21-42.

Mitchell, P. S., et al. (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10513-10518.

Mogilyansky, E. and I. Rigoutsos (2013). "The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease." Cell Death Differ **20**(12): 1603-1614.

Montecalvo, A., et al. (2012). "Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes." Blood **119**(3): 756-766.

Moore, K. J. and I. Tabas (2011). "Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis." Cell **145**(3): 341-355.

Morel, D. W., et al. (1983). "Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid." J Lipid Res **24**(8): 1070-1076.

Nagasawa, M., et al. (2008). "Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B." Eur J Immunol **38**(9): 2389-2400.

Nahid, M. A., et al. (2011). "Mechanistic role of microRNA-146a in endotoxin-induced differential cross-regulation of TLR signaling." J Immunol **186**(3): 1723-1734.

Napoli, C., et al. (1997). "Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions." J Clin Invest **100**(11): 2680-2690.

Naruko, T., et al. (2002). "Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes."

Circulation **106**(23): 2894-2900.

Nielsen, C. B., et al. (2007). "Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs." RNA **13**(11): 1894-1910.

Niessner, A., et al. (2006). "Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha." Circulation **114**(23): 2482-2489.

Niessner, A., et al. (2007). "Synergistic proinflammatory effects of the antiviral cytokine interferon-alpha and Toll-like receptor 4 ligands in the atherosclerotic plaque." Circulation **116**(18): 2043-2052.

Nishimura, H., et al. (1999). "Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor." Immunity **11**(2): 141-151.

O'Connell, R. M., et al. (2009). "Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(17): 7113-7118.

O'Connell, R. M., et al. (2008). "Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder." J Exp Med **205**(3): 585-594.

O'Connell, R. M., et al. (2007). "MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(5): 1604-1609.

O'Connell, R. M., et al. (2010). "MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development." Immunity **33**(4): 607-619.

O'Donnell, K. A., et al. (2005). "c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression." Nature **435**(7043): 839-843.

O'Keeffe, M., et al. (2002). "Effects of administration of progenipoietin 1, Flt-3 ligand, granulocyte colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice." Blood **99**(6): 2122-2130.

O'Rourke, J. R., et al. (2007). "Essential role for Dicer during skeletal muscle development." Dev Biol **311**(2): 359-368.

Olive, V., et al. (2009). "miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92." Genes Dev **23**(24): 2839-2849.

Olivieri, F., et al. (2013). "MiR-146a as marker of senescence-associated pro-inflammatory status in cells involved in vascular remodelling." Age (Dordr) **35**(4): 1157-1172.

Olofsson, P. S., et al. (2008). "CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice." Circulation **117**(10): 1292-1301.

Onai, N., et al. (2006). "Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development." J Exp Med **203**(1): 227-238.

Onai, N., et al. (2007). "Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow." Nat Immunol **8**(11): 1207-1216.

Onishi, Y., et al. (2008). "Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 10113-10118.

Packard, R. R., et al. (2008). "CD11c(+) dendritic cells maintain antigen processing, presentation capabilities, and CD4(+) T-cell priming efficacy under hypercholesterolemic conditions associated with atherosclerosis." Circ Res **103**(9): 965-973.

Pagliuca, A., et al. (1995). "Molecular cloning of ID4, a novel dominant negative helix-loop-helix human gene on chromosome 6p21.3-p22." Genomics **27**(1): 200-203.

Paulson, K. E., et al. (2010). "Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis." Circ Res **106**(2): 383-390.

- Paul, W. E. (2011). "Bridging innate and adaptive immunity." Cell **147**(6): 1212-1215.
- Peng, Y., et al. (2009). "Ly6C(low) monocytes differentiate into dendritic cells and cross-tolerize T cells through PDL-1." J Immunol **182**(5): 2777-2785.
- Pillai, R. S., et al. (2007). "Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?" Trends Cell Biol **17**(3): 118-126.
- Poitz, D. M., et al. (2013). "Regulation of the Hif-system by micro-RNA 17 and 20a - role during monocyte-to-macrophage differentiation." Mol Immunol **56**(4): 442-451.
- Probst, H. C., et al. (2003). "Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance." Immunity **18**(5): 713-720.
- Pryshchep, O., et al. (2008). "Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries." Circulation **118**(12): 1276-1284.
- Pulendran, B., et al. (2000). "Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo." J Immunol **165**(1): 566-572.
- Randolph, G. J., et al. (1999). "Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo." Immunity **11**(6): 753-761.
- Rodriguez, A., et al. (2007). "Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function." Science **316**(5824): 608-611.
- Rosa, A., et al. (2007). "The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(50): 19849-19854.
- Ross, R. and J. A. Glomset (1976). "The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)." N Engl J Med **295**(7): 369-377.
- Ross, R. (1976). "Atherosclerosis: the role of endothelial injury, smooth muscle proliferation and

platelet factors." Triangle **15**(2-3): 45-51.

Ross, R. and L. Harker (1976). "Hyperlipidemia and atherosclerosis." Science **193**(4258): 1094-1100.

Rydstrom, A. and M. J. Wick (2007). "Monocyte recruitment, activation, and function in the gut-associated lymphoid tissue during oral Salmonella infection." J Immunol **178**(9): 5789-5801.

Sakaguchi, S., et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-1164.

Sakaguchi, S., et al. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." Cell **133**(5): 775-787.

Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-1118.

Sasaki, N., et al. (2012). "Regulatory T cells in atherogenesis." J Atheroscler Thromb **19**(6): 503-515.

Sasaki, N., et al. (2009). "Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice." Circulation **120**(20): 1996-2005.

Sato, K., et al. (2005). "Downregulation of IL-12 and a novel negative feedback system mediated by CD25+CD4+ T cells." Biochem Biophys Res Commun **330**(1): 226-232.

Sato, K., et al. (2006). "TRAIL-expressing T cells induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in the atherosclerotic plaque." J Exp Med **203**(1): 239-250.

Satpathy, A. T., et al. (2012). "Re(de)fining the dendritic cell lineage." Nat Immunol **13**(12): 1145-1154.

Satpathy, A. T., et al. (2012). "Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their

committed progenitors from other immune lineages." J Exp Med **209**(6): 1135-1152.

Scheicher, C., et al. (1992). "Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." J Immunol Methods **154**(2): 253-264.

Schieffer, B., et al. (2004). "Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis." Circulation **110**(22): 3493-3500.

Schreiner, B., et al. (2004). "Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **155**(1-2): 172-182.

Serbina, N. V., et al. (2003). "TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection." Immunity **19**(1): 59-70.

Shamshiev, A. T., et al. (2007). "Dyslipidemia inhibits Toll-like receptor-induced activation of CD8alpha-negative dendritic cells and protective Th1 type immunity." J Exp Med **204**(2): 441-452.

Shen, L. H., et al. (2008). "Oxidized low-density lipoprotein induces differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic-like cells." Atherosclerosis **199**(2): 257-264.

Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-161.

Skalen, K., et al. (2002). "Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis." Nature **417**(6890): 750-754.

Small, E. M. and E. N. Olson (2011). "Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology." Nature **469**(7330): 336-342.

Smith, E., et al. (2010). "Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in

apolipoprotein E-deficient mice." Circulation **121**(15): 1746-1755.

Soehnlein, O. and C. Weber (2009). "Myeloid cells in atherosclerosis: initiators and decision shapers." Semin Immunopathol **31**(1): 35-47

Song, S., et al. (2014). "Dendritic cells with an increased PD-L1 by TGF-beta induce T cell anergy for the cytotoxicity of hepatocellular carcinoma cells." Int Immunopharmacol **20**(1): 117-123.

Spits, H., et al. (2000). "Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2." J Exp Med **192**(12): 1775-1784.

Steinberg, D. (1997). "Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance." J Biol Chem **272**(34): 20963-20966.

Steinberger, P., et al. (2004). "Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains." J Immunol **172**(4): 2352-2359.

Steinman, R. M. (2003). "The control of immunity and tolerance by dendritic cell." Pathol Biol (Paris) **51**(2): 59-60.

Steinman, R. M., et al. (2003). "Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance." Ann N Y Acad Sci **987**: 15-25.

Steinman, R. M. and K. Inaba (1999). "Myeloid dendritic cells." J Leukoc Biol **66**(2): 205-208.

Steinman, R. M. and M. D. Witmer (1978). "Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 5132-5136.

Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-1162.

Stemme, S., et al. (1991). "Polyclonal origin of T lymphocytes in human atherosclerotic plaques." Lab Invest **65**(6): 654-660.

Stewart, C. R., et al. (2010). "CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer." Nat Immunol **11**(2): 155-161.

Suarez, Y., et al. (2007). "Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells." Circ Res **100**(8): 1164-1173.

Suh, W. K., et al. (2003). "The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses." Nat Immunol **4**(9): 899-906.

Sun, C. M., et al. (2007). "Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid." J Exp Med **204**(8): 1775-1785.

Sun, J., et al. (2010). "Deficiency of antigen-presenting cell invariant chain reduces atherosclerosis in mice." Circulation **122**(8): 808-820.

Sun, M., et al. (2002). "Characterization of mouse and human B7-H3 genes." J Immunol **168**(12): 6294-6297.

Sunderkotter, C., et al. (2004). "Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response." J Immunol **172**(7): 4410-4417.

Swirski, F. K., et al. (2009). "Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites." Science **325**(5940): 612-616.

Tabas, I., et al. (2007). "Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications." Circulation **116**(16): 1832-1844.

Tacke, F., et al. (2007). "Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques." J Clin Invest **117**(1): 185-194.

Taganov, K. D., et al. (2006). "NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an

inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12481-12486.

Taleb, S., et al. (2009). "Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis." J Exp Med **206**(10): 2067-2077.

Tang, Q., et al. (2006). "Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice." Nat Immunol **7**(1): 83-92.

Tezuka, H., et al. (2007). "Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells." Nature **448**(7156): 929-933.

Tili, E., et al. (2007). "Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock." J Immunol **179**(8): 5082-5089.

Triboulet, R., et al. (2007). "Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication." Science **315**(5818): 1579-1582.

Trinath, J., et al. (2012). "Mycobacterium tuberculosis promotes regulatory T-cell expansion via induction of programmed death-1 ligand 1 (PD-L1, CD274) on dendritic cells." J Infect Dis **205**(4):694-696.

Tseng, S. Y., et al. (2001). "B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells." J Exp Med **193**(7): 839-846.

Turner, M. L., et al. (2011). "MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function." J Immunol **187**(8): 3911-3917.

Tyrrell, P. N., et al. (2010). "Rheumatic disease and carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(5): 1014-1026.

Urbich, C., et al. (2008). "Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis." Cardiovasc Res **79**(4): 581-588.

Valadi, H., et al. (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." Nat Cell Biol **9**(6): 654-659.

van de Laar, L., et al. (2012). "Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy." Blood **119**(15): 3383-3393.

van Rooij, E., et al. (2008). "Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 13027-13032.

Van Vre, E. A., et al. (2006). "Decreased number of circulating plasmacytoid dendritic cells in patients with atherosclerotic coronary artery disease." Coron Artery Dis **17**(3): 243-248.

Van Vre, E. A., et al. (2008). "Human C-reactive protein activates monocyte-derived dendritic cells and induces dendritic cell-mediated T-cell activation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 511-518.

Varol, C., et al. (2007). "Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells." J Exp Med **204**(1): 171-180.

Varol, C., et al. (2009). "Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions." Immunity **31**(3): 502-512.

Veillard, N. R., et al. (2004). "Differential expression patterns of proinflammatory and antiinflammatory mediators during atherogenesis in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(12): 2339-2344.

Ventura, A., et al. (2008). "Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters." Cell **132**(5): 875-886.

Vickers, K. C., et al. (2011). "MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins." Nat Cell Biol **13**(4): 423-433.

Vigorito, E., et al. (2007). "microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-

switched plasma cells." Immunity **27**(6): 847-859.

Villadangos, J. A. and L. Young (2008). "Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells." Immunity **29**(3): 352-361.

von Hundelshausen, P. and C. Weber (2013). "[Chronic inflammation and atherosclerosis]." Dtsch Med Wochenschr **138**(37): 1839-1844.

von Schlieffen, E., et al. (2009). "Multi-hit inhibition of circulating and cell-associated components of the toll-like receptor 4 pathway by oxidized phospholipids." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(3): 356-362.

Vremec, D., et al. (1997). "The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs." Eur J Immunol **27**(1): 40-44.

Vremec, D., et al. (2007). "Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells." Blood **109**(3): 1165-1173.

Wang, L., et al. (2008). "Toll-like receptor-4 and mitogen-activated protein kinase signal system are involved in activation of dendritic cells in patients with acute coronary syndrome." Immunology **125**(1): 122-130.

Wang, W. B., et al. (2011). "STAT3 negatively regulates type I IFN-mediated antiviral response." J Immunol **187**(5): 2578-2585.

Waskow, C., et al. (2008). "The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues." Nat Immunol **9**(6): 676-683.

Weber, C., et al. (2008). "The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models." Nat Rev Immunol **8**(10): 802-815.

Weber, J. A., et al. (2010). "The microRNA spectrum in 12 body fluids." Clin Chem **56**(11): 1733-1741.

Weis, M., et al. (2002). "Endothelial determinants of dendritic cell adhesion and migration: new implications for vascular diseases." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(11): 1817-1823.

Wing, K., et al. (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." Science **322**(5899): 271-275.

Xiao, C., et al. (2007). "MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb." Cell **131**(1): 146-159.

Xiao, C., et al. (2008). "Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes." Nat Immunol **9**(4): 405-414.

Xu, H., et al. (2009). "MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors." Cancer Res **69**(15): 6275-6281.

Yamazaki, S., et al. (2007). "Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors." Blood **110**(13): 4293-4302.

Yamazaki, T., et al. (2002). "Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC." J Immunol **169**(10): 5538-5545.

Yang, K., et al. (2011). "MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4." FEBS Lett **585**(6): 854-860.

Yilmaz, A., et al. (2004). "Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques." Atherosclerosis **176**(1): 101-110.

Yokota, Y., et al. (1999). "Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2." Nature **397**(6721): 702-706.

Yokota, Y. (2001). "Id and development." Oncogene **20**(58): 8290-8298.

Zaft, T., et al. (2005). "CD11chigh dendritic cell ablation impairs lymphopenia-driven proliferation of naive and memory CD8+ T cells." J Immunol **175**(10): 6428-6435.

Zenke, M. and T. Hieronymus (2006). "Towards an understanding of the transcription factor network of dendritic cell development." Trends Immunol **27**(3): 140-145.

Zernecke, A., et al. (2008). "Chemokines in atherosclerosis: an update." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(11): 1897-1908.

Zernecke, A., et al. (2008). "Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis." Circ Res **102**(2): 209-217.

Zernecke, A., et al. (2009). "Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection." Sci Signal **2**(100): ra81.

Zhang, G., et al. (2008). "Soluble CD276 (B7-H3) is released from monocytes, dendritic cells and activated T cells and is detectable in normal human serum." Immunology **123**(4): 538-546.

Zhang, G. B., et al. (2004). "Human recombinant B7-H3 expressed in E. coli enhances T lymphocyte proliferation and IL-10 secretion in vitro." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **36**(6): 430-436.

Zhang, J., et al. (2006). "Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors." Blood **107**(9): 3600-3608.

Zhang, X., et al. (2006). "Interleukin 12 induces T-cell recruitment into the atherosclerotic plaque." Circ Res **98**(4): 524-531.

Zhang, Y., et al. (2010). "Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration." Mol Cell **39**(1): 133-144.

Zhao, Y., et al. (2007). "Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2." Cell **129**(2): 303-317.

Zhou, B., et al. (2007). "miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(17): 7080-7085.

Zhou, H., et al. (2010). "miR-155 and its star-form partner miR-155* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells." Blood **116**(26): 5885-5894.

Zhou, M., et al. (2013). "MiR-17-92 cluster is a novel regulatory gene of cardiac ischemic/reperfusion injury." Med Hypotheses **81**(1): 108-110.

Zhu, S. N., et al. (2009). "GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions." J Exp Med **206**(10): 2141-2149.

7. Abbildungsverzeichnis

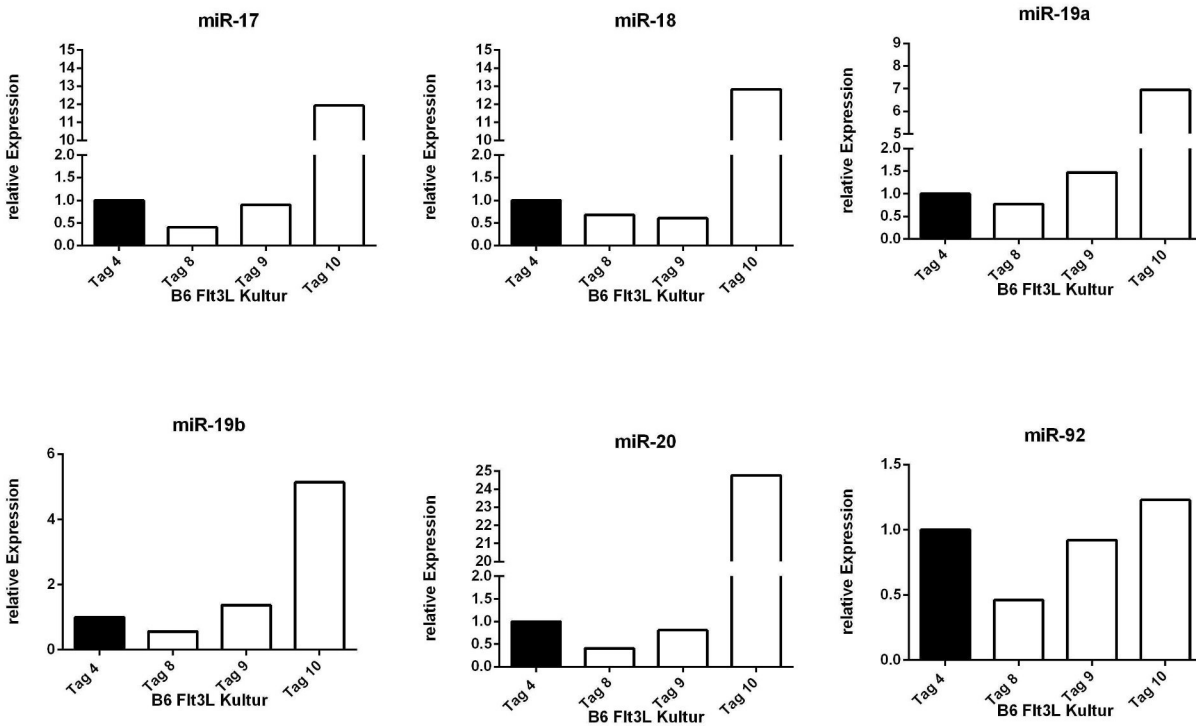


Abbildung 1: relative Änderung der Expression des miRNA Clusters 17-92 in einer Flt3L-Kultur aus Knochenmarkszellen des Femurs von acht bis zwölf Wochen alten B6 Mäusen, welche über einen Zeitraum von 10 Tagen kultiviert wurden. Es wurden jeweils an Tag vier, acht, neun und zehn Zellen entnommen und über eine RT-PCR die relative Häufigkeit der einzelnen miRNAs des Clusters bestimmt.

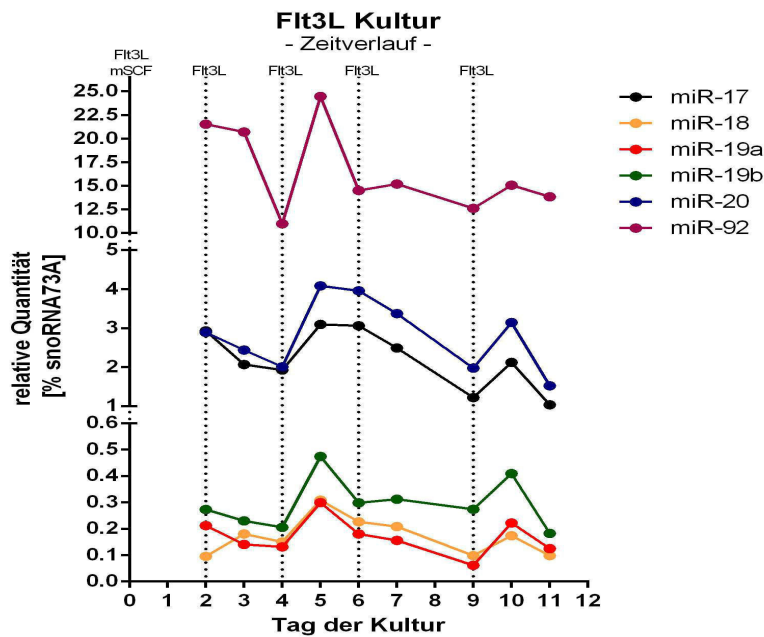


Abbildung 2 zeigt die Änderung der Expression einzelner miRNAs des miRNA 17-92 Clusters in einer Flt3L-Kultur dendritischer Zellen. Dazu wurden dieser täglich Zellen entnommen und deren RNA isoliert. Diese wurde in einer qRT-PCR in Bezug zur ubiquitär vorkommenden snoRNA73a quantifiziert. Die Grafik zeigt Einzelwerte, ohne statistische Relevanz

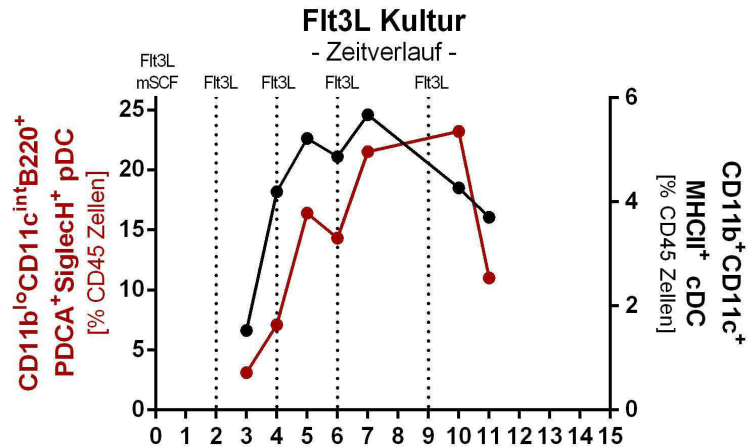


Abbildung 3 zeigt die Änderung der Expression einzelner miRNAs des miRNA 17-92 Clusters in einer Flt3L-Kultur dendritischer Zellen. Dazu wurden dieser täglich Zellen entnommen um mittels Zellsortierer die relative Menge an pDCs und cDCs in der Kultur zu bestimmen. Die Grafik zeigt Einzelwerte, ohne statistische Relevanz

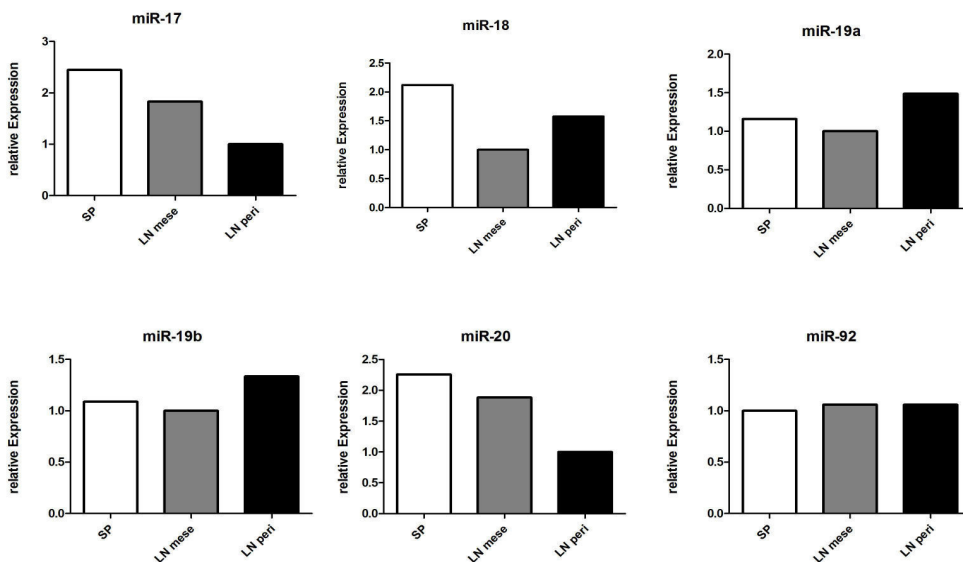


Abbildung 4 zeigt die relative Häufigkeit einzelner miRNAs des miRNA 17-92 Clusters in Organen von Bl-6 Mäusen. Dazu wurden den sechs bis acht Wochen alten Tieren die jeweiligen

Organe entnommen und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff fein gemahlen. Danach wurde die RNA extrahiert in cDNA umgeschrieben und mithilfe einer RT-PCR die relative Menge der einzelnen miRNAs bestimmt, wobei der niedrigste Wert als Norm verwendet wurde. Es handelt sich um Einzelwerte, ohne statistische Relevanz.

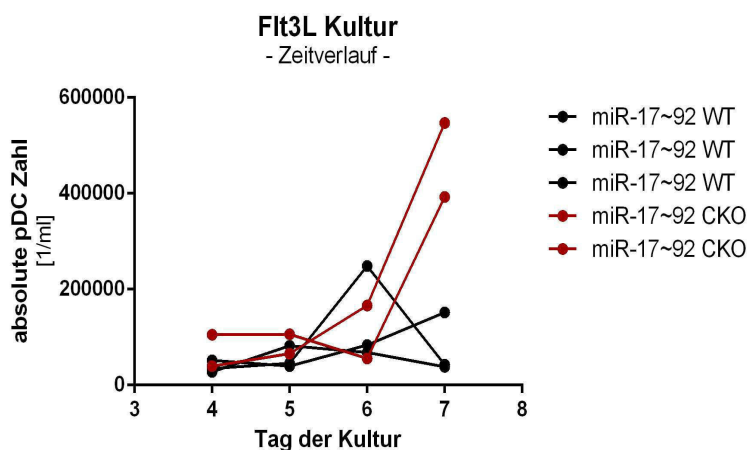


Abbildung 5: Zeitverlauf von fünf Flt3L-Kultur dendritischer Zellen aus Wildtyp Mäusen und konditionellen Knock-out Mäusen. An Tag vier, fünf, sechs und sieben wurden die Zellzahlen der Kulturen bestimmt und in den Graph eingetragen. Zu Beginn wurde den Kulturen mSCF und Flt3L zugesetzt, sowie am zweiten, vierten und sechsten Tag nochmals Flt3L eingebracht. Es handelt sich um Einzelwerte, ohne statistische Aussagekraft.

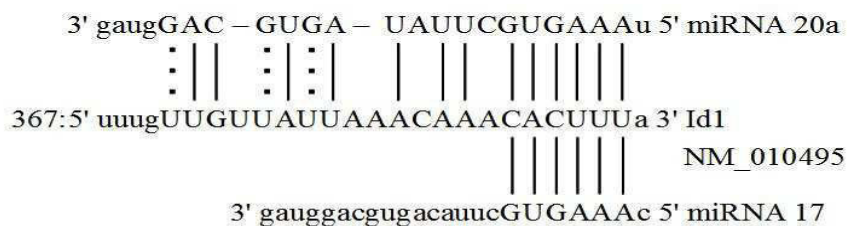


Abbildung 6: mögliche Bindungsstellen von miRNA 17 und miRNA 20a an Id1

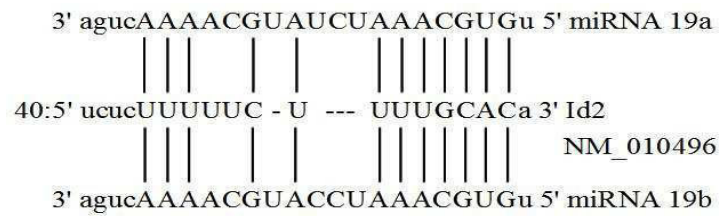


Abbildung 7: mögliche Bindungsstellen von miRNA 19a und miRNA 19b an Id2

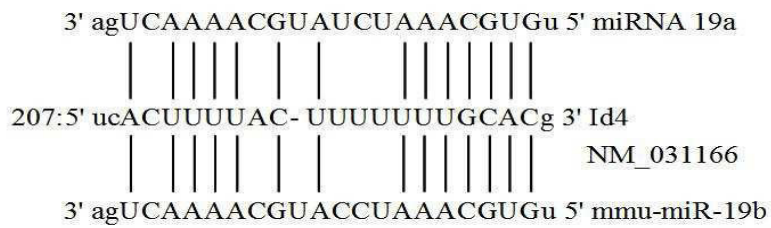


Abbildung 8: mögliche Bindungsstellen von miRNA 19a und miRNA 19b an Id4

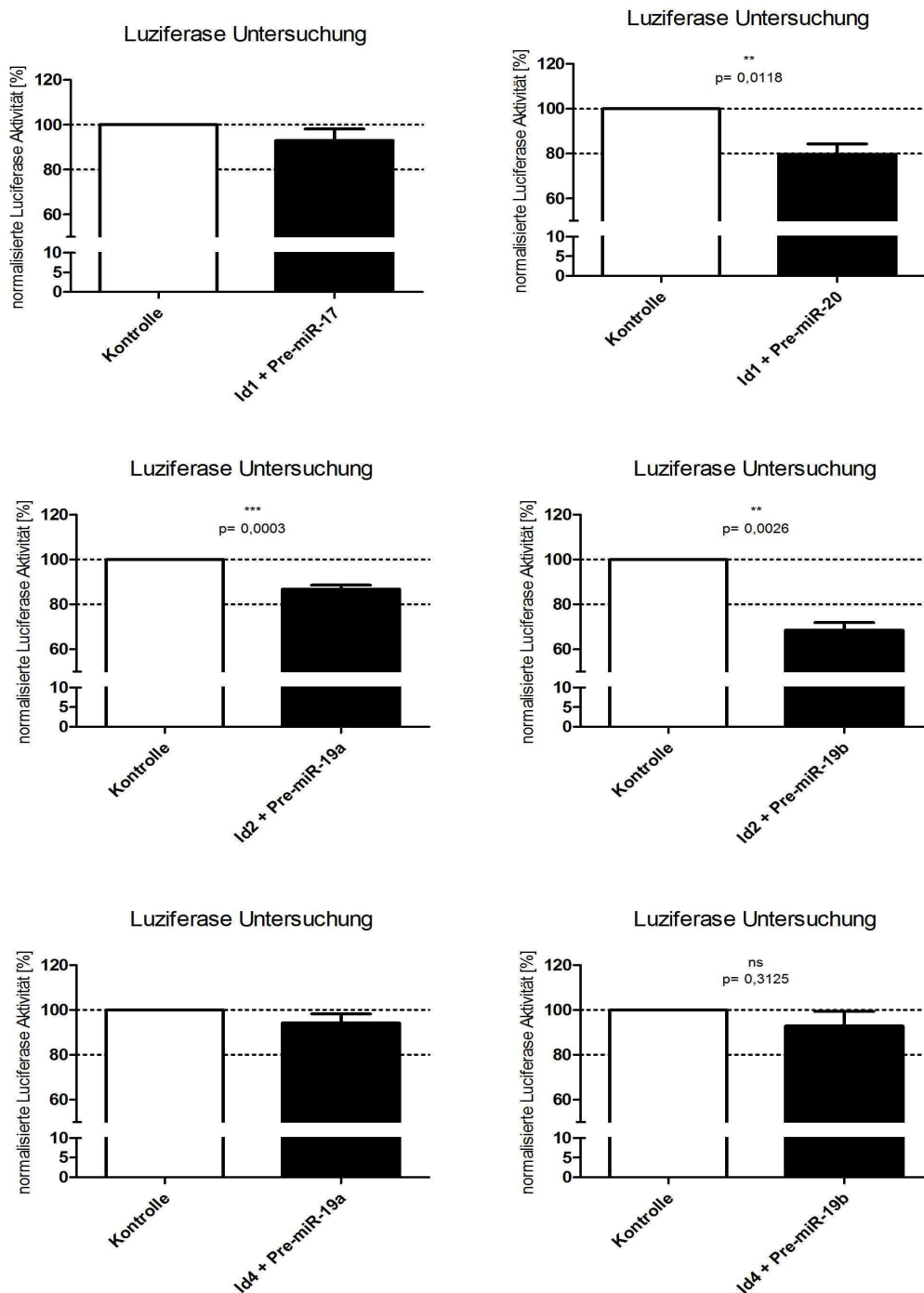


Abbildung 9: Luziferase Untersuchung, um Fähigkeit zur Bindung einzelner Mitglieder des miRNA 17-92 Clusters an verschiedenen Zielstellen der mRNA von Id-Proteinen zu überprüfen. Ein psiCheck2-Vektor mit den jeweiligen Bindungsstellen der Id-mRNAs wurde zusammen mit miRNA 17, miRNA 19a, miRNA 19b oder miRNA 20 oder einem miRNA-Kontroll-Mix in HEK293F-Zellen transfiziert und nach 24h die relative Luziferaseaktivität gemessen. Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler ($n=4-7$, $p>0,05$).

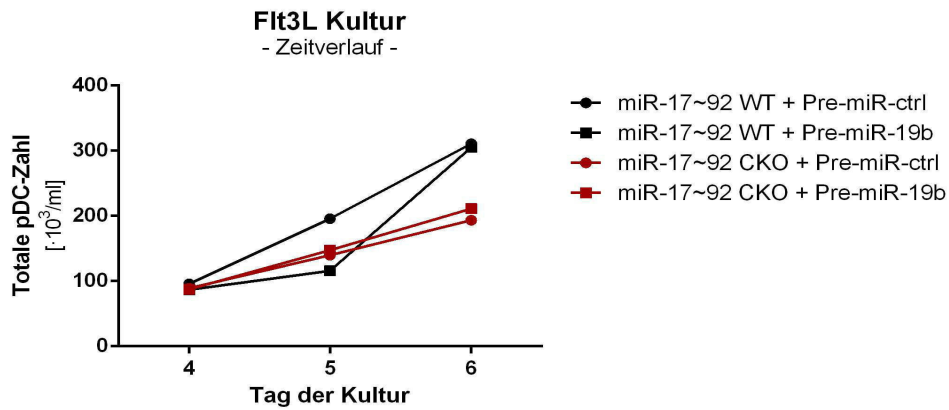


Abbildung 10: Zeitverlauf vierer Flt3L-Kultur dendritischer Zellen aus Wildtyp Mäusen und konditionellen Knock-out Mäusen, welche jeweils ein randomisiertes Gemisch verschiedener miRNAs oder spezifisch die miRNA 19b zugesetzt bekommen. An Tag vier, fünf und sechs wurden die Zellzahlen der Kulturen bestimmt und in den Graph eingetragen. Zu Beginn wurde den Kulturen mSCF und Flt3L zugesetzt, sowie am zweiten, vierten und sechsten Tag nochmals Flt3L eingebracht. Es handelt sich um Einzelwerte, ohne statistische Aussagekraft.

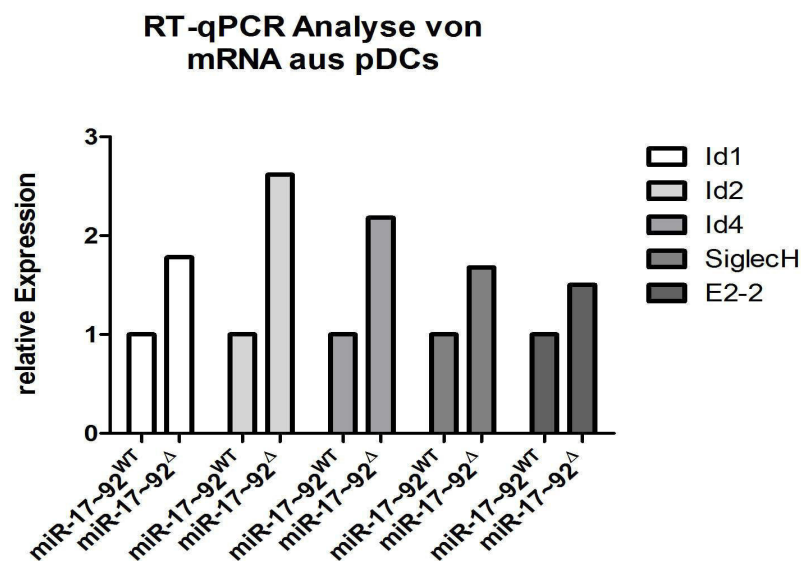


Abbildung 11: RT-qPCR Analyse von mRNAs aus pDC-Knochenmarks-Kulturen aus Bl6- oder miRNA 17-92 CKO Mäusen. Die mRNA wurde am siebten Kulturtag isoliert, in cDNA umgeschrieben und auf den absoluten Wert der mRNA im Wildtyp normalisiert. Die Grafik zeigt Einzelwerte, ohne statistische Relevanz

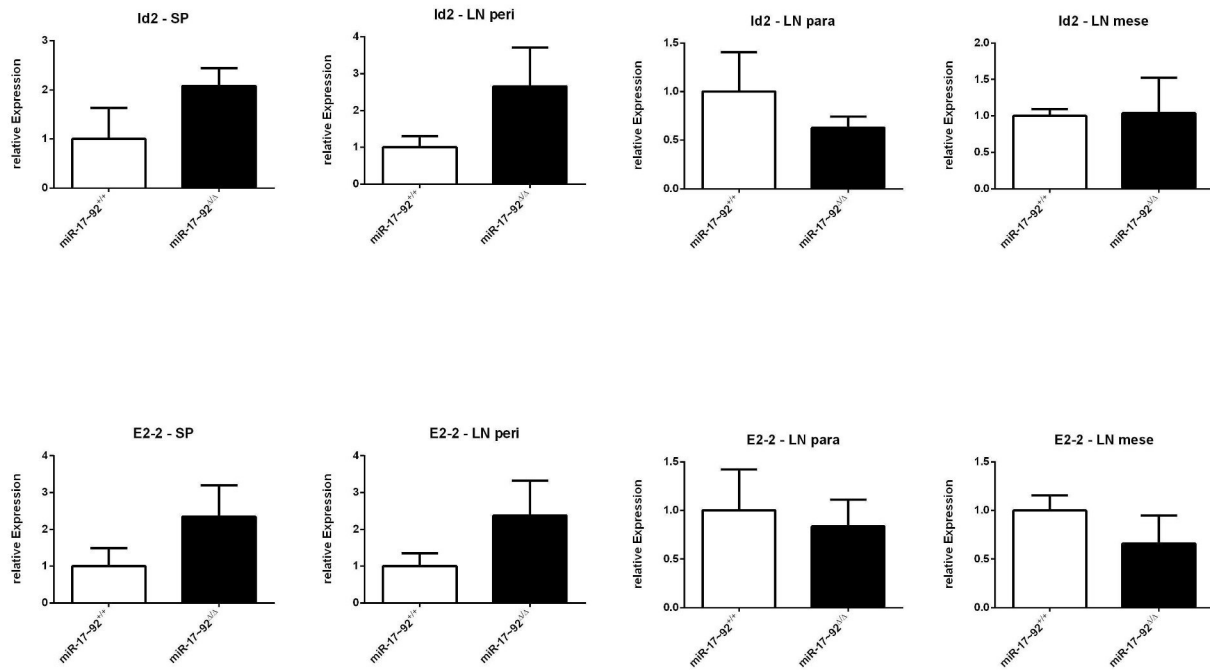


Abbildung 12 zeigt die relative Häufigkeit von Id2 oder E2-2 mRNA in Organen von vier BL/6 und vier miRNA 17-92 CKO Mäusen. Dazu wurden den sechs bis acht Wochen alten Tieren die jeweiligen Organe entnommen, die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mithilfe einer RT-PCR die relative Menge der einzelnen mRNAs bestimmt, wobei der niedrigste Wert als Norm verwendet wurde.

Danksagung

Diese Doktorarbeit konnte ich nur mit Hilfe vieler Personen schreiben, bei denen ich mir an dieser Stelle nochmals bedanken möchte.

Zu allererst möchte ich Alma Zernecke dafür danken, mir die Möglichkeit gegeben zu haben diese Thesis zu schreiben und Einblicke in die medizinische Grundlagenforschung zu gewinnen. Das Arbeiten in ihrer gut strukturierten Forschungsgruppe und die stetige Hilfestellung sind dabei besonders hervorzuheben. Für das tolle Betreuungsverhältnis nochmals vielen Dank!

Des weiteren danke ich Martin Busch, der sich der schweren Aufgabe annahm, einem Zahnmedizinstudenten mit Geduld und Enthusiasmus in die Laborarbeit einzuführen. Ich danke dir dafür herzlich, ohne dich wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Dein struktuiertes Arbeiten und Denken hat mir stets imponiert. Auch die vielen sportlichen Ausgleichsaktivitäten mit dir bleiben mir gut in Erinnerung.

Außerdem möchte ich Miriam Koch, Sweena Chaudhari, Helga Manthey, Theresa Henninger , Melanie Schott und Louisa Molinari für die tolle Zeit in der Forschungsgruppe danken. Es war eine tolle Atmosphäre in der Gruppe, Ihr standet mir stets mit Rat und Tat zur Seite und es gab oft Süßigkeiten – vielen Dank!

Abschließend möchte ich mich noch bei meiner Familie und meiner Freundin bedanken, dass ich mich immer auf sie verlassen konnte. Eure stetige Unterstützung und Motivation war für mich sehr wichtig.

Curriculum Vitae

Sebastian Beißler

Bildung

- September 1994 - Juli 1998 : Volkshochschule Glattbach
- September 1998 – Juli 2007 : Friedrich-Dessauer-Gymnasium Aschaffenburg

Studium

- April 2008 – Juni 2013 : Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg