

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Einfluss gram-positiver Stimuli auf die miRNA-Expression von Makrophagen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Georg Torsten Riechert

Betreuerin: apl. Prof. Dr. rer. nat. habil Julia Schumann

Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte, Halle (Saale)  
Prof. Dr. Michael Bauer, Jena

Datum der Verteidigung: 30.11.2023

*Diese Dissertation ist meiner wunderbaren Mutter gewidmet. Ihre Liebe, Unterstützung und Opferbereitschaft haben meine akademische Reise geprägt.*

*Dein Glaube an mich war meine größte Motivation. Diese Arbeit ist ein bescheidener Ausdruck meiner tiefen Dankbarkeit für deine selbstlose Hingabe.*

## Referat

Die Differenzierung von Makrophagen zum M1- bzw. M2-Typ ist für die erfolgreiche Bekämpfung von Pathogenen und die Aufrechterhaltung der Gesundheit von zentraler Bedeutung. Es ist bekannt, dass die Differenzierungskontrolle sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene stattfindet. Während die Vorgänge auf Ebene der Transkription in der Literatur bereits ausführlich beschrieben worden sind, besteht hinsichtlich der Kontrolle der Makrophagendifferenzierung auf posttranskriptioneller Ebene erheblicher Klärungsbedarf. Zentrale Vermittler der posttranskriptionellen Regulation sind nicht-kodierende kleine RNA-Moleküle, die sogenannten miRNAs. miRNAs gewährleisten die Feinabstimmung der Genexpression, indem sie die Stabilität und die Translationseffizienz von proteinkodierenden mRNAs beeinflussen. Die Interaktion zwischen miRNA und mRNA basiert auf partieller Komplementarität, so dass eine einzelne miRNA die Expression von Hunderten von verschiedenen mRNAs beeinflussen kann. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung verändert exprimierter miRNAs nach M1-Differenzierung durch gram-positive Stimulation. Durch Screening mittels Next Generation Sequencing (NGS)-Technologie und anschließender Validierung mittels Droplet Digital™ PCR (ddPCR) wurden 4 miRNAs ermittelt, welche in Folge einer gram-positiven Stimulation der Makrophagen signifikant aufreguliert waren: miR-7a-5p, miR-148a-3p, miR-155-5p und miR-351-5p. Mittels *in silico*-Analyse wurde bestätigt, dass die Gene von miR-7a-5p, miR-148a-3p und miR-155-5p Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP-1 enthalten. Dieser Transkriptionsfaktor wird bekanntermaßen nach gram-positiver Stimulation über den RAC1-PI3K-Akt-Signalweg und den MYD88-abhängigen Signalweg aktiviert, wodurch eine direkte Verbindung zwischen Stimulationsereignis und Expressionsänderung der miRNAs gegeben ist. Zudem zeigten die Ergebnisse der *in silico*-Analyse, dass die aufregulierten miRNAs auf Inhibitoren der NF $\kappa$ B-Aktivierung (z.B. CHUK und NFKBIB) und Mediatoren der M2-Differenzierung (z.B. AKT1, CREB1, CEBPB, SOCS1 und FOSL2) abzielen. Dies ist ein klarer Hinweis auf einen miRNA-vermittelten, selbstverstärkenden Effekt des RAC1-PI3K-Akt-Signalweges und des MYD88-abhängigen Signalweges. In der Summe wird in der vorliegenden Arbeit ein neuer posttranskriptioneller Mechanismus beschrieben, über welchem die Differenzierung von Makrophagen zum M1-Typ nach gram-positiver Stimulation begünstigt wird.

Riechert, Georg: Einfluss gram-positiver Stimuli auf die miRNA-Expression von Makrophagen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 72 Seiten, Erscheinungsjahr 2023

## I Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Makrophagen	1
1.1.1 Terminologie	1
1.1.2 Differenzierung von Makrophagen	2
1.2 Regulation der Makrophagendifferenzierung	2
1.2.1 Einfluss bakterieller Stimuli	4
1.2.2 Einfluss von PUFA	5
1.3. miRNAs	6
1.3.1 Terminologie	7
1.3.2 Analyse der zellulären miRNA Expression	7
1.3.3 <i>In silico</i> -Methoden zur Analyse von miRNAs	9
1.4 miRNAs und Makrophagendifferenzierung	10
2. Zielstellung	12
3. Material und Methodik	13
3.1 Materialien	13
3.1.1 Geräte	13
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	13
3.1.3 Reagenzien	14
3.1.4. Primer	15
3.1.5 verwendete Testgruppen der Zelllinie RAW264.7	15
3.1.7 Software und Datenbanken	17
3.2 Methodik	17
3.2.1 Kultivierung, Supplementierung und Stimulation der Zellkulturen RAW264.7	17
3.2.2 RNA-Isolierung	18
3.2.3 Bestimmung von RNA-Konzentration und -Reinheit am NanoVue	18
3.2.4 RNA-Aufreinigung mittels Fällung	19
3.2.5 Sequenzierung	19
3.2.6 miRNA-Validierung: cDNA-Synthese	20
3.2.7 miRNA-Validierung: ddPCR	20
3.2.8 <i>In silico</i> -Analyse für PCR-validierte miRNAs	22
3.2.9 <i>In silico</i> -Analyse des Transkriptoms	22
3.2.10 Statistische Auswertung	23
4. Ergebnisse	24
4.1 Sequenzierung	24
4.1.1 Transkriptom	24

4.1.2 miRNA-Profil	26
4.2 ddPCR	28
4.2.1 Experimentelle Validierung Stimulations-induzierter Expressionsveränderungen von miRNAs	28
4.2.2 Experimentelle Validierung PUFA-induzierter Expressionsveränderungen von miRNAs	30
4.3 <i>In silico</i> -Analyse	31
4.3.1 GSEA des Transkriptoms	31
4.3.2 TLR-assoziierte Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf die Expression der experimentell validierten miRNAs	34
4.3.3 Untersuchung der potenziell durch die verändert exprimierten miRNAs beeinflussten Prozesse	35
4.3.4 Ermittlung der Zielgene der verändert exprimierten miRNAs	37
4.4 Vergleich von gram-positiver mit gram-negativer Stimulation	39
5. Diskussion	44
6. Zusammenfassung	56
7. Literaturverzeichnis	59
8. Thesen	72

## II Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Differenzierung und Signaltransduktion von Makrophagen	3
<b>Abbildung 2:</b> miRNA-Expression in RAW264.7 nach gram-positiver Stimulation	29
<b>Abbildung 3:</b> miRNA-Expression nach PUFA-Supplementierung und Stimulation	30
<b>Abbildung 4:</b> Anreicherungsplots angereicherter Gen-Datensätze	33

### III Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Geräte	13
<b>Tabelle 2:</b>	Verbrauchsmaterialien	13
<b>Tabelle 3:</b>	Reagenzien	14
<b>Tabelle 4:</b>	Primer	15
<b>Tabelle 5:</b>	Testgruppen der murinen Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7	15
<b>Tabelle 6:</b>	Software und Datenbanken	17
<b>Tabelle 7:</b>	Anzahl identifizierter mRNAs nach Testgruppe	24
<b>Tabelle 8:</b>	Übersicht verändert exprimierter Gene nach gram-positiver Stimulation	25
<b>Tabelle 9:</b>	Anzahl identifizierter miRNAs nach Testgruppe	27
<b>Tabelle 10:</b>	miRNA Validierungskandidaten	27
<b>Tabelle 11:</b>	Übersicht signifikant veränderter Gen-Datensätze laut GSEA	31
<b>Tabelle 12:</b>	TLR-assoziierte Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf validierte miRNAs	34
<b>Tabelle 13:</b>	Clusteranalyse auf Basis der Zielgene verändert exprimierter miRNAs	36
<b>Tabelle 14:</b>	Anzahl der mittels miRWalk 2.0 ermittelten Zielgene	38
<b>Tabelle 15:</b>	Ausgewählte Zielgene der verändert exprimierten miRNAs	39
<b>Tabelle 16:</b>	Übersicht verändert exprimierten Gene nach gram-negativer Stimulation	40

<b>Tabelle 17:</b>	Gegenüberstellung verändert exprimierter miRNAs nach Stimulation	41
<b>Tabelle 18:</b>	TLR assoziierte Transkriptionsfaktoren im gram-negativen Milieu	41
<b>Tabelle 19:</b>	Zielgene der im gram-negativen Milieu verändert exprimierten miRNAs	43



#### IV Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AA	Arachidonsäure (engl. arachidonic acid)
Akt	AKT Serin/Threonin-Kinase (engl. AKT serine/threonine protein kinase)
AMPK	AMP-aktivierten Proteinkinase
ANOVA	Varianzanalyse (engl. analysis of variance)
AP-1	Aktivator-Protein-1 (engl. activating protein 1)
ATF4	aktivierender Transkriptionsfaktor 4 (engl. activating transcription factor 4)
BCL	B-Zell-Lymphom (engl. B-cell lymphoma)
CEBPB	CCAAT-Enhancer-Bindungsprotein $\beta$ (engl. CCAAT enhancer binding protein $\beta$ )
CHUK	Bestandteil des Inhibitors des Nuklearfaktor-Kappa-B-Kinase-Komplexes (engl. component of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase complex)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary DNA)
CD	Differenzierungscluster (engl. cluster of differentiation, CD)
CREB1	cAMP-responsive Element-Bindungsprotein 1 (engl. cAMP responsive element binding protein 1)
CSF1	Kolonie-stimulierender Faktor 1 (engl. colony stimulating factor 1)

ddPCR	digitale Tröpfchen-Polymerasekettenreaktion (engl. Droplet Digital™ PCR)
DHA	Dokosahexaensäure (engl. docosahexaenoic acid)
ELK1	ETS-ähnliches Protein-1 (engl. ETS like-1 protein)
FOS	Fos Protoonkogen ( engl. fos proto-oncogene)
FOSL	Fos-ähnlich (engl. FOS like)
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
GO	Gen-Ontologie (engl. gene ontology)
GPR120	G-Protein gekoppelten Rezeptor 120 (engl. G-protein coupled receptor 120)
GSEA	Gen-Set-Anreicherungsanalyse (engl. gene set enrichment analysis)
IFN-γ	Interferon-Gamma
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickmonoxid-Synthase
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (engl. interleukin-1 receptor-associated kinase 1)
IRF	Interferon-Regulationsfaktor (engl. Interferon regulatory factor, IRF)
VII	

JAK	Januskinase
JUN	Jun Protoonkogen ( engl. jun proto-oncogene)
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid (engl. lipopolysaccharide)
LTA	Lipoteichonsäure (engl. lipoteichoic acid)
LY96	Lymphozyten Antigen-96
M	molare Masse
MAP3K7	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 7 (engl. mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7)
MAP3K14	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 14 (engl. mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14)
MAX	Myc-assoziiertes Faktor X (engl. MYC associated factor X)
min	Minute
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure (engl. micro RNA)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger RNA)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MYC	Myc Protoonkogen (engl. myc proto-oncogene)
MyD88	Myeloides Differenzierungsprotein 88 (engl. myeloid differentiation primary response 88)
VIII	

N	biologisches Replikat
n	technisches Replikat
NFATC	Kernfaktor der aktivierten T-Zellen (engl. nuclear factor of activated T cells)
NFκB	Kernfaktor kappa B (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NFKBIB	NFκB-Inhibitor beta
NFKB1	NFκB Untereinheit 1 (engl. Nuclear Factor Kappa B Subunit 1)
ng	Nanogramm
NGS	Sequenzierung der nächsten Generation (engl. next generation sequencing)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase (engl. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (engl. peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog (engl. phosphatase and tensin homolog )
PUFA	mehrfach ungesättigten Fettsäuren (engl. polyunsaturated fatty acids)
IX	

RAC1	ras-verwandtes C3 Botulinum Toxinsubstrat 1 (engl. ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)
Real-Time PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RELA	RELA Protoonkogen, NFκB Untereinheit (engl. RELA Proto-Oncogene, NFκB Subunit)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (engl. reactive nitrogen species)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
s	Sekunde
SOCS1	Suppressor der Zytokin-Signalübertragung 1 (engl. suppressor of cytokine signaling 1)
STAT	Signalgeber und Aktivator der Transkription (engl. signal transducer and activator of transcription, STAT)
TGF-β	transformierender Wachstumsfaktor beta (engl. transforming growth factor-β)
TLR	Toll-artiger Rezeptor (engl. toll-like receptor)
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
U/min	Umdrehungen pro Minute
μg X	Mikrogramm

μl

Mikroliter

°C

Grad Celsius

## 1. Einleitung

### 1.1 Makrophagen

Makrophagen sind Zellen der angeborenen Immunabwehr, welchen eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Beseitigung von Krankheitserregern und Zelldebris zukommt. (Martinez et al. 2008). Kennzeichnend ist eine phänotypische Plastizität. In Abhängigkeit von äußeren Stimuli erfolgt eine Differenzierung in verschiedene Subtypen, welche sich hinsichtlich Funktion unterscheiden (Abbildung 1) (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Entsprechend hat die Regulation der Makrophagendifferenzierung grundlegende Bedeutung für die Kontrolle von Pathogenen sowie die Aufrechterhaltung der menschlichen Gesundheit. Eine Dysregulation wirkt sich sowohl auf akute als auch chronische Entzündungsreaktionen aus und wird mit pathophysiologischen Prozessen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von onkologischen Erkrankungen, Autoimmunprozessen, Allergien, Adipositas, Atherosklerose und parasitären Erkrankungen in Verbindung gebracht (Sica und Mantovani 2012; Zhou et al. 2014; Orecchioni et al. 2019).

#### 1.1.1 Terminologie

Funktionell werden 2 Subtypen von Makrophagen unterschieden: der klassisch aktivierte M1-Phänotyp sowie der alternativ aktivierte M2-Phänotyp (Abbildung 1) (Chávez-Galán et al. 2015). M1-Makrophagen wirken proinflammatorisch und setzen die Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sowie reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies frei (Abbildung 1). Durch die ausgeschütteten Zytokine wird die Entzündungsreaktion verstärkt und die erworbene Immunantwort gefördert. Die ausgeschütteten reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies (Abbildung 1) wirken direkt antimikrobiell, bedingen aber auch Zellschäden im Rahmen der akuten Pathogenabwehr. Zudem sind M1-Makrophagen durch eine verstärkte Antigenpräsentation sowie antivirale Effekte gekennzeichnet. Somit nehmen sie eine entscheidende Rolle in der akuten Entzündungsreaktion ein (Martinez und Gordon 2014; Atri et al. 2018; Shapouri-Moghaddam et al. 2018) M2-Makrophagen wirken hingegen antiinflammatorisch und setzen antientzündliche Zytokine, wie IL-10 und transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$  (engl. transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) frei (Abbildung 1). Makrophagen des M2-Typs sind zudem durch eine hohe Phagozytoseaktivität gekennzeichnet (Abbildung 1) und nehmen eine Schlüsselrolle in der Förderung der Wundheilung ein, indem sie

apoptotische Zellen beseitigen und mittels der von ihnen ausgeschütteten Botenstoffe die Angiogenese und die Fibrose fördern. M2-Makrophagen, dämpfen die akute Immunantwort und verhindern somit eine pathologisch überschießende Immunreaktion (Sica und Mantovani 2012; Martinez und Gordon 2014; Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

### **1.1.2 Differenzierung von Makrophagen**

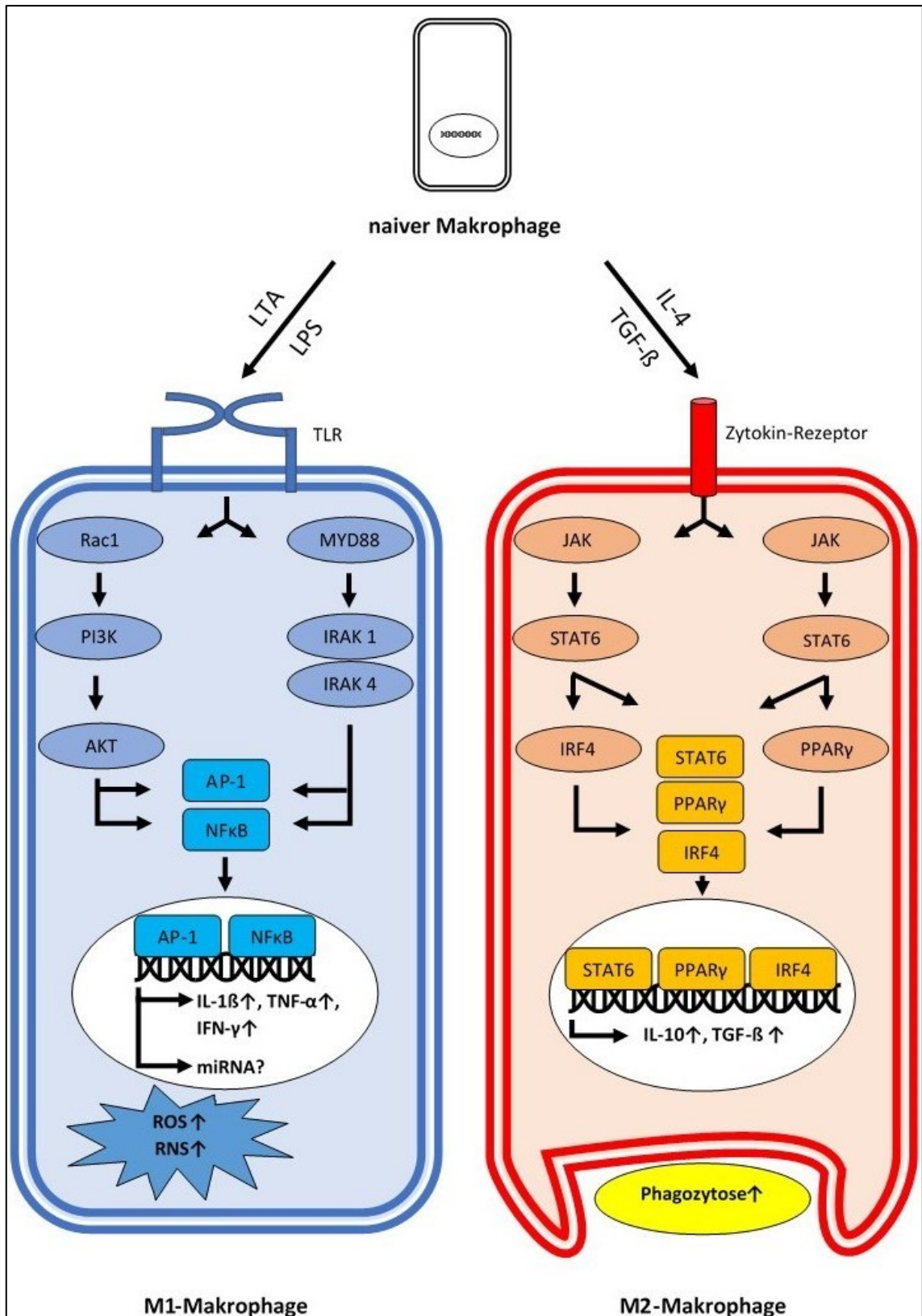
Die Differenzierung der naiven Monozyten zu Makrophagen des M1- bzw. M2-Phänotyps wird durch die Bindung äußerer Stimuli an Membranrezeptoren der Immunzellen induziert. Die Weiterleitung des Signals erfolgt über intrazelluläre Signalkaskaden, welche regulierend auf die Genexpression der Makrophagen einwirken. Die Änderungen im Proteinexpressionsprofil resultieren in funktionellen Anpassungen und der Ausbildung eines spezialisierten Phänotyps. Die klassische Aktivierung und damit Differenzierung zum M1-Makrophagen wird unter anderem durch bakterielle Zellwandbestandteile (gram-positive Bakterien: Lipoteichonsäure (engl. lipoteichoic acid, LTA); gram-negative Bakterien: Lipopolysaccharid (engl. lipopolysaccharide, LPS), IFN- $\gamma$ , und den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) bewirkt (Abbildung 1). Eine alternative Aktivierung und Differenzierung zum M2-Phänotyp wird hingegen durch den Kolonie-stimulierenden Faktor 1 (engl. colony stimulating factor 1, CSF1), TGF- $\beta$ , die Interleukine IL-4, IL-10 und IL-13, sowie Infektionen mit Helminthen ausgelöst (Abbildung 1) (Chávez-Galán et al. 2015; Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

### **1.2 Regulation der Makrophagendifferenzierung**

Die Differenzierung von Makrophagen in den M1- bzw. M2-Typ wird sowohl auf der Ebene der Transkription als auch posttranskriptionell reguliert.

Die Transkription beinhaltet das Umschreiben der in der DNA gespeicherten genetischen Information in ein Transkript, die sogenannte Boten-RNA (engl. Messenger RNA, mRNA), welches Ausgangspunkt der Synthese von Genprodukten (d.h. von Proteinen) ist. Die nach Detektion bakterieller Stimuli induzierten Signalkaskaden münden in der Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren, welche Einfluss auf die Transkriptionsrate bestimmter Gene nehmen. Durch Interaktion mit spezialisierten Abschnitten der Promotorregion, den Enhancern oder Silencern, regulieren spezifische Transkriptionsfaktoren direkt die Menge einer mRNA. Die Beeinflussung der Makrophagendifferenzie-





**Abbildung 1:** Differenzierung und Signaltransduktion von Makrophagen (selbst erstellte Übersicht auf Grundlage von Lawrence und Natoli 2011; Juhas et al. 2015)

zung mittels Modulation der mRNA-Synthese wird als transkriptionelle Regulation bezeichnet. Für die Differenzierung zum M1-Phänotyp sind vor allem die Transkriptions-

faktoren Kernfaktor kappa B (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NFκB) und Aktivator-Protein-1 (engl. activating protein 1, AP-1) verantwortlich. Weitere bedeutsame Transkriptionsfaktoren für die Ausbildung von M1-Makrophagen sind Signaltransducer und Aktivator der Transkription 1 (engl. signal transducer and activator of transcription, STAT) und Interferon-Regulationsfaktor 5 (engl. Interferon regulatory factor, IRF) (Abbildung 1) (Lawrence und Natoli 2011; Juhas et al. 2015). Mit der Differenzierung von M2-Makrophagen werden hingegen die Transkriptionsfaktoren IRF4, STAT6 sowie Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (engl. peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARγ) in Verbindung gebracht (Abbildung 1) (Lawrence und Natoli 2011; Juhas et al. 2015).

Von der transkriptionellen Regulation ist die posttranskriptionelle Regulation abzugrenzen. Hier wird die Genexpression durch Interaktion mit der bereits transkribierten mRNA beeinflusst, wobei sowohl die Stabilität der mRNA als auch die Effizienz der Translation verändert sein kann (Filipowicz et al. 2008). Die posttranskriptionelle Regulation wurde erstmals im Jahr 1993 in Zusammenhang mit der Beschreibung kleiner nicht-kodierender RNAs, den Mikro-Ribonukleinsäuren (engl. micro RNA, miRNA), beschrieben (Lee et al. 1993) und ist Gegenstand aktueller Forschung. Während die Regulation der Makrophagendifferenzierung durch transkriptionelle Regulation bereits gut verstanden ist, stehen detaillierte Kenntnisse zu den posttranskriptionellen Mechanismen bislang aus.

### **1.2.1 Einfluss bakterieller Stimuli**

Makrophagen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche verschiedene Rezeptoren zur Detektion einer bakteriellen Infektion. Von besonderer Bedeutung sind die Vertreter der Tollartigen Rezeptorfamilie (engl. Toll-like receptors, TLR) (Abbildung 1). Die nach TLR-Aktivierung induzierten Signalkaskaden und nachfolgenden Prozesse sind bereits umfassend beschrieben.

Für die Erkennung von LTA, einem Zellwandbestandteil gram-positiver Bakterien, ist TLR2 von Bedeutung, welcher nach Bindung seines Liganden Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 bildet. Das Adaptermolekül ras-verwandtes C3 Botulinum Toxinsubstrat 1 (engl. ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1) vermittelt die Weiterleitung des Signals über die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (engl. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PI3K) sowie der AKT Serin/Threonin-Kinase (engl. AKT serine/threonine protein kinase, Akt) im Rahmen des RAC1-PI3K-Akt-Signalweges (Abbildung 1). Ein zweiter wichtiger Signalweg, der sogenannte MYD88-abhängige Signalweg, beginnt mit dem Adapterprotein Myeloides Differenzierungsprotein 88 (engl.

myeloid differentiation primary response 88, MyD88), welches die Interleukin-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen 1 und 4 (engl. interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK) aktiviert (Abbildung 1) (Ogata et al. 1999; Takeda und Akira 2004; Takeda und Akira 2015). Beide Signalwege münden in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB, welche wie bereits ausgeführt, die Differenzierung der Makrophagen zum M1-Phänotyp vermitteln (Abbildung 1).

Die Bindung von LPS, einem Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, erfolgt durch das Membranprotein Cluster der Differenzierung CD14 (engl. cluster of differentiation 14, CD14), welches daraufhin mit TLR4 interagiert (Ogata et al. 1999; Takeda und Akira 2004; Takeda und Akira 2015). Zwei TLR4-Rezeptoren bilden anschließend ein Homodimer, welches mit MyD88 interagieren kann. Über MyD88 wird das Signal intrazellulär weitergeleitet, wodurch IRAK 1 und IRAK 4 aktiviert werden (Abbildung 1). In der Folge werden die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB wirksam, wodurch die Ausprägung des M1-Phänotyps induziert wird (Abbildung 1) (Ogata et al. 1999; Takeda und Akira 2004; Takeda und Akira 2015).

### **1.2.2 Einfluss von PUFA**

Unter mehrfach ungesättigten Fettsäuren (engl. polyunsaturated fatty acids, PUFA) werden Fettsäuren verstanden, die multiple Doppelbindungen enthalten. Nach Position der ersten Doppelbindung, gezählt vom Kohlenstoffatom, das sich am gegenüberliegenden Ende der Carboxylgruppe befindetet, werden verschiedene PUFA-Familien (n3, n6, n7, n9) unterschieden (Wiktorowska-Owczarek et al. 2015; Waehler 2021). Immunologisch bedeutsam sind vor allem Vertreter der n3- und n6-PUFA, wie Dokosahexaensäure (engl. docosahexaenoic acid, DHA) und Arachidonsäure (engl. arachidonic acid, AA) (Christie und Harwood 2020). DHA gehört zur n3-Familie und weist bei einer Kettenlänge von 22 C-Atomen 6 Unättigungen auf (Formel: C22:6n3) (Shahidi und Ambigaipalan 2018). Ebenfalls hochgradig ungesättigt ist die n6-PUFA AA (Formel: C20:4n6) (Innes und Calder 2018). Bisherige Untersuchungen zeigen, dass beide Fettsäuren die Makrophagenfunktion beeinflussen. Supplementierung von Makrophagen mit DHA oder AA reduziert die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, erhöht die Phagozytoserate der Immunzellen und fördert die Differenzierung zum M2-Phänotyp (Schoeniger et al. 2011; Adolph et al. 2012; Kawano et al. 2019).

Den antiinflammatorischen Effekten der PUFA liegen mehrere Mechanismen zu Grunde. PUFA sind Ausgangspunkt für die Synthese von Eikosanoiden und Resolvinen, welche als Immunmodulatoren unmittelbar auf den Aktivitätszustand von Immunzellen Einfluss

nehmen (Calder 2008; Serhan et al. 2008). Eikosanoide wirken proinflammatorisch. Interessanterweise sind Eikosanoide, welche von PUFA der n3-Familie abgeleitet sind, weniger effektstark als die ausgehend von n6-PUFA synthetisierten Eikosanoide (Calder 2001). Resolvine sind unabhängig von der Art der PUFA, aus denen sie synthetisiert wurden, stets antiinflammatorisch wirksam (Abdolmaleki et al. 2020). Darüber hinaus sind n3-PUFA Liganden der Rezeptoren PPAR $\gamma$  und G-Protein gekoppelten Rezeptor 120 (engl. G-protein coupled receptor 120, GPR120), welche nachweislich die Differenzierung von Makrophagen zum M2-Phänotyp vermitteln (Calder 2008; Da Oh et al. 2010). Diskutiert wird zudem eine Beeinflussung zellulärer Signaltransduktionsprozesse durch PUFA. Supplementierte PUFA werden in die Membran von Makrophagen eingebaut, wodurch die Zusammensetzung der Membran moduliert wird. Besonders ausgeprägte Effekte finden sich in den lipid rafts (Calder 2008; Serhan et al. 2008; Da Oh et al. 2010). Lipid rafts sind spezialisierte Membrandomänen, welche als Plattform für Signalkaskaden dienen. Eine Anreicherung von PUFA in den lipid rafts, welche typischerweise reich an gesättigten Fettsäuren sind, beeinflusst die Membranlokalisierung von Rezeptorproteinen und wirkt sich nachweislich negativ auf die nach LPS-Stimulation in der Membran stattfindende Komplexbildung von TLR4 und CD14 aus (Schoeniger et al. 2016). Im Gegensatz dazu wurde bei gram-positiver Stimulation kein Effekt einer PUFA-Supplementierung auf die Heterodimerenbildung von TLR2 mit TLR1 bzw. TLR6 beobachtet (Hellwing et al. 2018).

Nach der Entdeckung von miRNAs als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression, wurden in einem Rattenmodell erste Effekte einer PUFA-Supplementierung auf das miRNA-Profil gezeigt (Zheng et al. 2015). Dies führte zur Formulierung der Hypothese, dass die nach PUFA-Supplementierung veränderte Lipidzusammensetzung der Zellmembranen die Genexpression im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens nicht nur auf transkriptioneller sondern auch auf posttranskriptioneller Ebene beeinflussen könnte (Schumann 2016). Diese Hypothese wurde aber bisher nicht experimentell überprüft.

### **1.3. miRNAs**

Als miRNAs wird eine eigene Gruppe Ribonukleinsäuren (engl. ribonucleic acid, RNA) mit einer Länge von 19 bis 24 Nukleotiden bezeichnet, die vorrangig als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression fungieren (Jonas und Izaurralde 2015). miRNAs interagieren mit der mRNA durch Bindung an (partiell) komplementäre Zielsequenzen, woraus eine negative Beeinflussung der Translation resultiert. Zudem wurde gezeigt,

dass durch die Interaktion mit der mRNA Faktoren rekrutiert werden, die die mRNA-Stabilität reduzieren und zum mRNA-Abbau führen. Seit der Entdeckung der ersten miRNA „lin-4“ in einem Nematoden durch Lee und Kollegen im Jahr 1993 (Lee et al. 1993) wurden stetig neue miRNAs auch beim Menschen identifiziert. Die im Jahr 2002 etablierte Datenbank miRBase listet in ihrem aktuellen Release 22.1 insgesamt 38589 Vorläufer-miRNAs sowie 48860 reife miRNAs aus 271 verschiedenen Organismen auf (Kozomara et al. 2019; miRBase 10.09.2022). In der Datenbank werden außerdem Informationen zu den miRNA-Sequenzen, Nomenklatur sowie Zielgenen gesammelt (Griffiths-Jones 2004; Griffiths-Jones et al. 2008; miRBase 10.09.2022). Die Zunahme der Anzahl identifizierter miRNAs in den letzten Jahrzehnten spiegelt das wachsende Interesse und die Bedeutung der miRNAs in der aktuellen Forschung wider.

### **1.3.1 Terminologie**

Für die Terminologie der miRNAs wurde im Sinne einer Standardisierung ein einheitliches System etabliert (Ambros et al. 2003; Griffiths-Jones 2004; Griffiths-Jones et al. 2006; Griffiths-Jones et al. 2008). Vorangestellt wird eine Kennzeichnung des Organismus, in dem die miRNA exprimiert wird. Das Präfix „hsa“ steht für *Homo sapiens*, kennzeichnet also eine humane miRNA. Bei murinen miRNAs wurde der Terminus „mmu“ für *Mus musculus* festgelegt. Dem Präfix folgt der Begriff „miR“ bzw. „mir“, wobei „miR“ für eine reife mRNA verwendet wird, während „mir“ sowohl für das miRNA-Gen als auch die Vorläufer-miRNA steht (Desvignes et al. 2015; Jonas und Izaurralde 2015). miRNAs werden numerisch aufsteigend in der Reihenfolge benannt, in der sie entdeckt bzw. erstbeschrieben wurden. Bei einigen miRNAs gibt es verschiedene Mitglieder einer Familie, die alphabetisch von „a“ beginnend bezeichnet werden, wobei der Buchstabe an die Zahl der Erstbeschreibung angehängt wird (Desvignes et al. 2015). Der letzte Teil der Bezeichnung kennzeichnet die zueinander komplementären miRNAs die im Prozess der Reifung aus der doppelsträngigen prä-miRNA hervorgehen. Der Terminus „5p“ steht dabei für das 5' Ende der Vorläufer-miRNA, während „3p“ das komplementäre 3' Ende beschreibt (Griffiths-Jones et al. 2011; Jonas und Izaurralde 2015).

### **1.3.2 Analyse der zellulären miRNA Expression**

Der Nachweis und die Quantifizierung von miRNAs erfordert je nach Zielstellung verschiedene, in der Umsetzung anspruchsvolle, labortechnische und bioinformatische Methoden. Zum Einsatz kommen die Sequenzierung, Hybridisierungstechniken auf Basis

von Microarrays sowie die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Real-Time PCR) (Kolbert et al. 2013; Saliminejad et al. 2019). Sequenzierung und Hybridisierung werden vorrangig zum Screenen nach potenziell interessanten miRNA-Kandidaten genutzt. Zur Validierung identifizierter Expressionsunterschiede von miRNAs steht laut der microRNA quality control (miRQC)-Studie mit der Real-Time PCR eine geeignetere Methode zu Verfügung (Mestdagh et al. 2014).

Die Sequenzierung der nächsten Generation (engl. next generation sequencing, NGS) ermöglicht es, sowohl bekannte als auch neue miRNAs zu identifizieren. Es ist möglich, die genaue Sequenz zu analysieren und miRNA-Varianten zu differenzieren, die sich hinsichtlich einzelner Nukleotide oder in der Isomer-Länge unterscheiden (Pritchard et al. 2012). Aufgrund der hohen Sensitivität eignet sich die Sequenzierung insbesondere zum miRNA-Screening. Die gewonnenen umfangreichen Datensätze müssen bioinformatisch aufgearbeitet und analysiert werden (Pop und Salzberg 2008). Ein wesentlicher Schritt ist das sogenannte Alignment, bei welchem die bei der Sequenzierung erhaltenen „reads“ einem Referenzgenom zugeordnet werden.

Hybridisierungsverfahren mit Microarrays basieren auf der von Watson und Crick beschriebenen Eigenschaft der komplementären Basenpaarung von Nukleinsäuren (Kong et al. 2009). Für die Verwendung der Microarrays muss daher die nachzuweisende miRNA-Sequenz bekannt sein. Außerdem kann im Gegensatz zu Sequenzierungsverfahren die Auswahl der zu analysierende miRNAs in Microarrays nachträglich nicht mehr geändert oder erweitert werden. Genutzt werden Microarrays sowohl für das Screenen nach bekannten miRNAs als auch zum Nachweis von Änderungen in der miRNA-Expression (Git et al. 2010).

Zur Validierung von Expressionsänderungen von miRNAs kommt in der Regel die Real-Time PCR zum Einsatz. Bei klassischen Verfahren der Real-Time PCR wird zur Auswertung ein Referenzgen benötigt, dessen Expression unbeeinflusst durch die Bedingungen des Experimentes bleiben sollte (Wong und Medrano 2005). Um dies zu gewährleisten, muss experimentell nachgewiesen werden, dass das gewählte Referenzgen stabil und unabhängig von den äußeren Bedingungen exprimiert wird (Schmittgen und Zakrajsek 2000; Reid et al. 2011; D'haene et al. 2012; Benz et al. 2013). Für miRNAs existieren keine universellen Referenzgene. Zudem ist bekannt, dass die in der Literatur mehrheitlich beschriebenen Referenzgene unter inflammatorischen Bedingungen Änderungen im Expressionsprofil zeigen (Reid et al. 2011). Entsprechend werden für die Analyse entzündlicher Prozesse unterschiedliche Referenzgenkandidaten diskutiert (Schlosser et al. 2015; Hirschberger et al. 2019; Link et al. 2019). Die Prüfung der generellen Nutzbarkeit dieser vorgeschlagenen miRNAs als Referenzgene steht aber noch aus. Eine neue Methode zur Umgehung dieser Problematik ist die digitale Tröpfchen-PCR (engl. Droplet

Digital™ PCR, ddPCR) (Hindson et al. 2013). Bei der ddPCR wird die Probe auf ca. 20.000 Wasser-in-Öl-Tropfen definierter Größe verteilt, in welchen die PCR-Reaktion erfolgt (Pinheiro et al. 2012). Durch Fluoreszenzmarkierung kann jeder Tropfen auf amplifizierte DNA untersucht werden. Die Anzahl der DNA-Kopien/µl Probe wird anschließend unter Annahme einer Poisson-Verteilung aus den gemessenen positiven und negativen Tropfen errechnet. Eine Normalisierung oder Kalibrierung mittels Kalibratorsubstanzen bzw. Referenzgen entfällt hierdurch (Huggett et al. 2013; Campomenosi et al. 2016)

### 1.3.3 *In silico*-Methoden zur Analyse von miRNAs

*In silico*-Methoden nutzen künstliche Intelligenz zur Generierung von Erkenntnissen (Ekins et al. 2007). Daten aus molekularen und klinischen Studien werden organisiert und analysiert, um Vorhersagen zu treffen (Yu 2008). Es existieren zahlreiche frei zugängliche Datenbanken, mit deren Hilfe Informationen aus experimentell generierten Sequenzierdaten abgeleitet werden können (Murray et al. 2007). Zu den Datenbanken für die Analyse von miRNAs zählen unter anderem miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2>), ClueGO (<https://apps.cytoscape.org/apps/cluego>) und GeneCards (<https://www.genecards.org>).

Die Datenbank miRWalk 2.0 stellt Basisinformationen zu miRNAs bereit, welche bislang bei den Spezies Mensch, Maus, Ratte, Kuh, Hund und Zebrafisch identifiziert wurden. Dies umfasst Identifikationsnummern, Genort, regulatorische Bindungsstellen und die Basensequenz der Haarnadelstrukturen (Dweep et al. 2014). Ferner werden experimentell validierte sowie putative Zielgene gelistet (Sticht et al. 2018). Zur Identifizierung experimentell validierter Zielgene kommt ein Programm zum Einsatz, welches automatisch die Titel und Kurzbeschreibungen von in PubMed gelisteten wissenschaftlichen Fachartikeln nach miRNAs durchsucht (Dweep et al. 2011) und die Ergebnisse mit Informationen aus den Datenbanken miRTarBase4.0, PhenomiR2.0, miR2Disease und HMDD2.0 abgleicht (Dweep und Gretz 2015). Zur Ermittlung putativer Zielgene dient ein spezieller Algorithmus („TarPmiR“) (Ding et al. 2016; Sticht et al. 2018), dessen Ergebnisse um die Informationen aus 12 weiteren Datenbanken (Diana-microT, Diana-microT-CDS, miRanda, miRBridge, miRDB, miRMap, miRNAMap, doRiNA (PICTAR2), PITA, RNA22, RNAhybrid und Targetscan) ergänzt werden (Dweep und Gretz 2015).

ClueGO führt ausgehend von einem Datensatz von miRNA-Zielgenen eine Anreicherungsanalyse durch, in welcher Gencluster in funktionell gruppierte Netzwerke geordnet werden (Bindea et al. 2009). Die Analyse basiert auf Begriffen der Gen-Ontologie sowie

Informationen über den Ablauf biologischer Prozesse aus Datenverzeichnissen wie KEGG, WikiPathways und Reactome (Mlecnik et al. 2019). Neben der Darstellung der Ergebnisse in Netzwerken, Diagrammen und Tabellen erfolgt auch eine statistische Auswertung (Bindea et al. 2009).

Die Datenbank Genecards enthält eine Auflistung aller annotierten und vorgeschlagenen humanen Gene (Version 5.11; Stand Juni 2022: 337221 Gene). Es werden Informationen aus über 150 Datenquellen zusammengefasst, wodurch eine umfassende Analyse von miRNA-Genen ermöglicht wird (Safran et al. 2021). Dies beinhaltet die Ermittlung sämtlicher bekannter Transkriptionsfaktoren, welche nachweislich die Expression einer bestimmten miRNA beeinflussen.

#### **1.4 miRNAs und Makrophagendifferenzierung**

Das miRNA-Expressionsprofil funktionell differenzierter Makrophagen ist in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt. Mehrere Arbeitsgruppen haben unabhängig voneinander gezeigt, dass Makrophagen des M1- oder M2-Typs sich hinsichtlich der exprimierten miRNAs unterscheiden. In vergleichenden Studien wurden M1-Makrophagen mit einer erhöhten Expressionsrate von miR-125b, miR-127, miR-127-3p, miR-146a-5p, miR-147b, miR-147-3p, miR-155-3p, miR-155-5p, miR-181a, miR-204-5p, miR-29b-3p, miR-451, miR-9 und miR-9-5p sowie einer erniedrigten Expressionsrate von miR-125-5p, miR-143-3p, miR-145-5p und miR-146a-3p in Verbindung gebracht. Im Gegensatz dazu wurden bei M2-Makrophagen die miRNAs let-7c, miR-124, miR-125a-5p, miR-125b-5p, miR-132, miR-146a, miR-193b-3p, miR-23a-5p, miR-27a-5p, miR-223, miR-34a, miR-511 und miR-99b als herauf- und die miRNAs miR-181a-5p, miR-181b-5p und miR-200a-3p als herunterreguliert beschrieben (Zhang et al. 2013b; Cobos Jiménez et al. 2014; Essandoh et al. 2016; Lu et al. 2016).

Einschränkend ist jedoch festzuhalten, dass die als verändert exprimiert identifizierten miRNAs zwischen den Studien variierten. Einzig die verstärkte Expression von miR-155-5p bei M1-Differenzierung wurde übereinstimmend berichtet. Die Varianzen zwischen den Studien, trotz Analyse differenzierter Makrophagen gleichen Phänotyps, weisen auf die Existenz weiterer Einflussfaktoren hin. Methodische Unterschiede der Studien lassen die Vermutung zu, dass sowohl die Herkunft der Zellen als auch die Art des Differenzierungs-auslösenden Stimulus, bei gleichem resultierendem Phänotyp, einen Einfluss auf das miRNA-Expressionsprofil haben könnte.

Die Differenzierung von Makrophagen zum M1-Typ wird von Zellwandbestandteilen gram-positiver wie auch gram-negativer Bakterien induziert. Bisherige Vorarbeiten zum



miRNA-Expressionsprofil nach M1-Differenzierung fokussierten auf die Effekte von LPS aus der Zellwand gram-negativer Bakterien, wobei Expressionsänderungen der miRNAs miR-9-5p, miR-27b-3p und miR-93-5p festgestellt wurden. Bei miR-9-5p und miR-27b-3p wurde eine Aufregulation und bei miR-93-5p eine Herunterregulation beobachtet (Bazzoni et al. 2009; Jennewein et al. 2010; Xu et al. 2014). Interessanterweise beeinflussen diese miRNAs die Expression von zentralen Mediatoren des Rac1-PI3K-Akt-Signalweges und der MyD88-abhängigen Signalkaskade, wodurch eine Verbindung zur M1-Differenzierung von Makrophagen gezogen werden kann (Nahid et al. 2011; O'Neill et al. 2011; Li und Shi 2013; Arenas-Padilla und Mata-Haro 2018). Die Auswirkungen einer Aktivierung von Makrophagen mit gram-positiven Stimuli, wie LTA, sind hingegen bisher nur unzureichend untersucht. Einzelne Studien berichten eine erhöhte Expression der miRNA miR-155-5p nach Kontakt mit den gram-positiven Bakterien *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* oder *Mycobacterium bovis* (Schnitger et al. 2011; Ghorpade et al. 2012; Verschoor et al. 2014). Diese miRNA wird als kritisch für die Differenzierung von Makrophagen zum M1-Phänotyp diskutiert (Lu et al. 2016). In der Tat ging ein Knockout von miR-155-5p in Makrophagen mit einer reduzierten Eliminierung von *Streptococcus pneumoniae* und *Mycobacterium bovis* einher (Ghorpade et al. 2012; Verschoor et al. 2014). Ungeachtet der eindrücklichen Befunde hinsichtlich der Bedeutung einer posttranskriptionellen Beeinflussung für die Makrophagenfunktionalität ist in der Fachliteratur keine vergleichende Untersuchung des miRNA-Profiles von Makrophagen nach gram-positiver bzw. gram-negativer Stimulation dokumentiert.

## 2. Zielstellung

Makrophagen kommt eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem zu. Aufgrund ihrer Plastizität sind sie in der Lage, mittels Differenzierung zum M1- oder M2-Typ adäquat auf Stimuli zu reagieren. Eine Dysregulation der Makrophagendifferenzierung ist entsprechend mit pathophysiologischen Prozessen im akuten wie auch chronischen Setting assoziiert.

In der Fachliteratur finden sich umfangreiche Untersuchungen zu den Mechanismen der Makrophagendifferenzierung auf Ebene der Transkription. Mit der Beschreibung von miRNAs rückt jedoch die Bedeutung posttranskriptioneller Mechanismen in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Detaillierte Erkenntnisse zu relevanten Mediatoren und den ablaufenden Mechanismen stehen bislang allerdings aus.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe belegen eine Veränderung des miRNA-Profiles von Makrophagen nach gram-negativer Stimulation. Inwiefern dies auch im gram-positiven Setting zutrifft, ist jedoch nicht beschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Identifizierung der nach gram-positiver Stimulation von Makrophagen verändert exprimierten miRNAs. Mittels *in silico*-Analyse sollte zudem ein Modell der posttranskriptionellen Regulationsmechanismen der M1-Differenzierung erstellt werden. Ein integraler Bestandteil dieses Modells war die Gegenüberstellung der gefundenen miRNAs und ihren Zielgenen nach gram-positiver und gram-negativer Stimulation.

In der Literatur finden sich erste Hinweise auf einen PUFA-Effekt auf die miRNA-Expression im Rattenmodell. Dies wirft die Frage auf, ob die immunologische Wirkung von PUFA ergänzend zu den bereits bekannten Mechanismen auch durch eine posttranskriptionelle Beeinflussung der Genexpression vermittelt sein könnte. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Prüfung eines potentiellen Effektes von PUFA auf die miRNA-vermittelte posttranskriptionelle Regulation der Makrophagendifferenzierung

### 3. Material und Methodik

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Geräte

**Tabelle 1:** Geräte

<b>Geräte-Name</b>	<b>Hersteller</b>
Bio Rad DG8 Cartridge Holder	Bio Rad (München)
Eismaschine UBE 30-35	Ziegra (Isernhagen)
Eppendorf Reference® Pipetten 2,5; 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Gefrierschrank	Liebherr (Rostock)
Heraeus™ Fresco™ 21b Microzentrifuge	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
Mehrkanalpipette, Acura 855	Socorex (Ecublens, Schweiz)
Mehrkanalpipette, Rainin L8-50XLS+	Mettler-Toledo (Gießen)
Microplate TS100 Thermo Shaker	bioSan (Riga, Lettland)
Mikrozentrifuge 6000 U/min	A. Hartenstein (Würzburg)
NanoVue™ Plus Spectrophotometer	GE Healthcare Europe (Freiburg)
PX1 PCR Plate Sealer	Bio Rad (München)
QX200™ Droplet Generator	Bio Rad (München)
QX200™ Droplet Reader	Bio Rad (München)
T100™ Thermocycler	Bio Rad (München)
TProfessional Basic Gradient Thermocycler	Biometra (Göttingen)
Vortex Genie™ 2	Scientific Industries (Bohemia, NY; USA)
Waldner Laborabzug 2100 Bioanalyzer Instrument	Waldner Laboreinrichtungen (Wangen) Agilent (Santa Clara, CA; USA)

##### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2:** Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
BioCean™ Pipette Tips in Green Pak®	Mettler-Toledo (Gießen)
Biosphere® Filter Tips 0,5-20 µl und 2- 100µml	Sarstedt (Nümbrecht)

**Tabelle 2:** Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung)

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
DG8TM Cartridges	Bio-Rad (München)
DG8TM Gaskets	Bio-Rad (München)
Falcon® Conical Tube 15ml	Corning Incorporated (Corning, NY; USA)
Handschuhe Sempercare® premium	Sempermed (Gevelsberg)
Hard Shell PCR Plates, 96 well, thin wall	Bio-Rad (München)
Kryoboxen PP, 45 - 50 mm	A.Hartenstein (Würzburg)
Multi-Guard Barrier Tips	Sorenson BioScience (Salt Lake City, UT; USA)
Multimark 1513 permanent	Faber-Castel (Geroldsgrün)
PCR-8er-Kette Multiply-μStrip	Sarstedt (Nümbrecht)
PCR Plate Heat Seal, foil, pierceable	Bio-Rad (München)
SafeSeal Reagiergefäße 0,5ml; 1,5ml und 2,5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Tesafilm Klebeband, transparent	tesa SE (Norderstedt)
8er Deckelkette, flach	Sarstedt (Nümbrecht)

### 3.1.3 Reagenzien

**Tabelle 3:** Reagenzien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Arachidonsäure	Biotrend, (Köln)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dokosahexaensäure	Biotrend, (Köln)
Ethanol, absolut (200 Proof)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Ethanol, Laboratory Reagent 70%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
GlycoBlue™ Co-Fällungsmittel	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Invitrogen™ Ammoniumacetat (5M)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Isopropanol ≥ 99.5%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lipopolysaccharid von <i>E. coli</i> Serotyp 0111:B4	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lipoteichonsäure von <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
miRCURY LNA RT Kit	Qiagen (Hilden)
QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix	Bio-Rad (München)
QX200™ Droplet Generation Oil for EvaGreen	Bio-Rad (München)

**Tabelle 3:** Reagenzien (Fortsetzung)

Name	Hersteller
<i>Rhodococcus equi</i> virulent ATCC® 6939™	LGC Standards (Wesel)
TRIzol™ Reagent	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Turbo DNA-free™ Kit	Thermo Fischer Scientific (Dreieich)
Wasser, RNase-frei	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

### 3.1.4. Primer

**Tabelle 4:** Primer

Name	Hersteller
miRCURY LNA miRNA PCR Assays geeignet für murine Proben:	Qiagen (Hilden)
let-7a-5p	miR-7a-5p
miR-100-5p	miR-101a-3p
miR-101b-3p	miR-106b-5p
miR-1198-5p	miR-142a-3p
miR-142a-5p	miR-148a-3p
miR-15b-5p	miR-151-3p
miR-155-5p	miR-16-5p
miR-16-1-3p	miR-183-5p
miR-186-5p	miR-21a-5p
miR-27b-3p	miR-340-5p
miR-351-5p	miR-3535
miR-425-5p	miR-615-3p
miR-9-5p	miR-93-5p
UniSp6	

### 3.1.5 verwendete Testgruppen der Zelllinie RAW264.7

**Tabelle 5:** Testgruppen der murinen Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7

Name	Behandlung
Kontrolle	0,2 % Ethanol für 72 h
LTA	0,2 % Ethanol für 72 h; Stimulation mit LTA (0,5 µg/ml) in den letzten 24 h der Ethanol-Behandlung
DHA	Supplementierung mit DHA (gelöst in 0,2 % Ethanol, Endkonzentration im Zell-

**Tabelle 5:** Testgruppen der murinen Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 (Fortsetzung)

Name	Behandlung
	kulturmedium 15 µmol/l) für 72 h
AA	Supplementierung mit AA (gelöst in 0,2 % Ethanol, Endkonzentration im Zellkulturmedium 15 µmol/l) für 72 h
LTA + DHA	Supplementierung mit DHA (gelöst in 0,2 % Ethanol, Endkonzentration im Zellkulturmedium 15 µmol/l) für 72 h; Stimulation mit LTA (0,5 µg/ml) in den letzten 24 h der Supplementierung
LTA + AA	Supplementierung mit AA (gelöst in 0,2 % Ethanol, Endkonzentration im Zellkulturmedium 15 µmol/l) für 72 h; Stimulation mit LTA (0,5 µg/ml) in den letzten 24 h der Supplementierung
<i>R. equi</i>	0,2 % Ethanol für 72 h; Stimulation mit lebenden, virulenten <i>Rhodococcus equi</i> ATCC® 6939TM (Verhältnis Bakterien zu RAW264.7 = 1:10) in den letzten 24 h der Ethanol-Behandlung
<i>R. equi</i> + DHA	Supplementierung mit DHA (gelöst in 0,2 % Ethanol, Endkonzentration im Zellkulturmedium 15 µmol/l) für 72 h; Stimulation mit lebenden, virulenten <i>Rhodococcus equi</i> ATCC® 6939TM (Verhältnis Bakterien zu RAW264.7 = 1:10) in den letzten 24 h der Supplementierung
<i>R. equi</i> + AA	Supplementierung mit AA (gelöst in 0,2 % Ethanol, Endkonzentration im Zellkulturmedium 15 µmol/l) für 72 h; Stimulation mit lebenden, virulenten <i>Rhodococcus equi</i> ATCC® 6939TM (Verhältnis Bakterien zu RAW264.7 = 1:10) in den letzten 24 h der Supplementierung
LPS	0,2 % Ethanol für 72 h; Stimulation mit LPS (1 µg/ml, <i>E. coli</i> Serotyp 0111:B4) in den letzten 24 h der Ethanol-Behandlung

### 3.1.7 Software und Datenbanken

**Tabelle 6:** Software und Datenbanken

Name	Software Entwickler
ClueGo Version 2.5.7	Laboratory of Integrative Cancer Immunology (Team 15) (Paris, Frankreich)
Cytoscape Version 3.7.2	Cytoscape Consortium (San Diego, CA; USA)
GeneCards Version 5.1.0 Build 379	Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel)
GraphPad Prism Version 9	GraphPad Software (San Diego, CA; USA)
KEGG Pathway Database Release 98.0	Kanehisa Laboratories (Kyoto, Japan)
miRWalk 2.0	Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim (Mannheim)
Microsoft Office Standard 2019 Version 1808	Microsoft (München)
QuantaSoft™ Software 1.7.4.0917	Bio-Rad (München)

## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Kultivierung, Supplementierung und Stimulation der Zellkulturen RAW264.7

Für das Forschungsprojekt wurden RNA-Proben der murinen Monozyten/Makrophagen Zelllinie RAW264.7 (ATCC® TIB-71™) genutzt. Die Zellkultur erfolgte durch Claudia Rößler, wissenschaftliche Mitarbeiterin des Forschungslabors für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Halle (Saale). Insgesamt wurden 10 Testgruppen untersucht, die sich hinsichtlich Supplementierungs- und Stimulationsstatus unterschieden (siehe Tabelle 5).

Zur Supplementierung der RAW264.7 mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurde entweder DHA oder AA in Ethanol gelöst und in einer Endkonzentration von 15 µmol/l dem Zellkulturmedium für 72 h zugesetzt. Die Endkonzentration von Ethanol im Zellkulturmedium betrug 0,2 %. Vor diesem Hintergrund wurden auch alle weiteren Untersuchungsgruppen einschließlich der Kontrolle für 72 h mit 0,2 % Ethanol behandelt.

Die gram-positive Stimulation der RAW264.7 erfolgte für 24 h entweder durch Versetzung des Zellkulturmediums mit LTA in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml oder durch

Ko-Kultivierung der RAW264.7 mit lebenden virulenten Bakterien (*Rhodococcus equi*, ATCC 6939) in einem Verhältnis Bakterien zu RAW264.7 1:10. Die gram-negative Stimulation der RAW264.7 erfolgte für 24 h durch Versetzung des Zellkulturmediums mit LPS in einer Endkonzentration von 1 µg/ml. Im Fall einer Kombination von Fettsäuren-Supplementierung und Stimulation erfolgte die Stimulation in den letzten 24 h der Supplementierungsphase.

### **3.2.2 RNA-Isolierung**

Die Arbeiten wurden unter dem Laborabzug durchgeführt. Es wurden pro 0,25 ml Probe 0,75 ml Trizol Reagent in das jeweilige 2 ml Reaktionsgefäß hinzugegeben, auf- und abpipettiert und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Anschließend wurde 0,2 ml Chloroform hinzugefügt, 20 s geschüttelt und erneut 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben für 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Von den nun erkennbaren 3 Phasen wurde die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 µl GlycoBlue™ (Tabelle 3) und 0,5 ml Isopropanol versetzt, kräftig geschüttelt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 min bei oben genannten Einstellungen bildete sich ein Präzipitat, welches durch Abnahme des Überstandes isoliert werden konnte. Es folgten zwei Waschschriffe durch Zugabe von 0,9 ml eiskaltem 70%igen Ethanol, erneutem Zentrifugieren für 10 min und Abpipettieren des flüssigen Überstandes. Abschließend wurde das Pellet für 10 min bei 50 °C und 500 rpm unter Nutzung des Microplate TS 200 Thermo Shaker (Tabelle 1) getrocknet, mit je 20 µl Ribonuklease (RNase) -freiem Wasser versetzt und bei -80 °C gelagert.

### **3.2.3 Bestimmung von RNA-Konzentration und -Reinheit am NanoVue**

Mittels des Spektrophotometers NanoVue™ Plus (Tabelle 1) wurde die RNA-Konzentration und -Reinheit über die Messung der Absorption der Proben bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Nach Starten des Gerätes, Auswahl des Programmes „Life Science“ und des Unterpunktes „RNA“, wurde das Gerät mit 1,5 µl RNase -freiem Wasser kalibriert und anschließend für jede RNA-Probe die Messung mit 1 µl Probe durchgeführt. Die Grenzwertfestlegung für ausreichend reine RNA erfolgte für das Absorptionsverhältnis 260 nm/280 nm bei  $\geq 1,8$  und für das Absorptionsverhältnis 260 nm/230 nm bei  $\geq 2,0$ .



### 3.2.4 RNA-Aufreinigung mittels Fällung

RNA-Proben, welche die in Kapitel 3.2.3 benannten Kriterien der RNA-Reinheit nicht erfüllten, wurden einer Aufreinigung mittels Fällung unterzogen. Hierzu wurde jede Probe mit 3 M Ammoniumacetat (Verhältnis Probenvolumen zu Ammoniumacetat 10:1) und absolutem Ethanol (Verhältnis Probenvolumen zu Ethanol 1:3) versetzt. Die Proben wurden mittels Vortex (Tabelle 1) gemischt und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die gefrorenen Proben bei 12000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes vom Pellet schloss sich ein Waschschriff durch die Zugabe von 0,9 ml 70%igen Ethanol sowie nachfolgend eine Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C für 30 min an. Erneut wurde der Überstand abpipettiert und anschließend das Pellet im Microplate TS 200 Thermo Shaker (Tabelle 1) für 10 min bei 50 °C und 500 rpm getrocknet. Die getrockneten Proben wurden mit jeweils 20 µl RNase-freiem Wasser versetzt und entsprechend Kapitel 3.2.3 hinsichtlich RNA-Konzentration und Reinheit analysiert. Alle Proben, welche den Reinheitskriterien entsprachen, wurden bei -80 °C gelagert.

### 3.2.5 Sequenzierung

Die Durchführung der Sequenzierung erfolgte durch die Firma Novogene, Cambridge mithilfe des NovaSeq™ 6000-Sequenziersystem. Es wurde von identischen Proben jeweils ein Profil des Transkriptoms und der nachweisbaren miRNAs erstellt. Analysiert wurden die Testgruppen a) Kontrolle, b) LTA, c) LTA + AA und d) LTA + DHA. Es wurden je 500 ng isolierte und aufgereinigte RNA von jeweils 3 Proben je Testgruppe eingesendet. Diese Proben waren zur vollständigen Beseitigung von DNA zuvor mit dem Turbo DNA-free™ Kit (Tabelle 3) entsprechend Herstellerangaben behandelt worden. Weiterhin wurde vor Probenversand die Qualität der RNA mittels Bioanalyzer (Tabelle 1) geprüft. Es wurden ausschließlich Proben mit einem Absorptionsverhältnis 260 nm/280 nm  $\geq 2,0$ , einem Absorptionsverhältnis 260 nm/230 nm  $\geq 2,0$  und RNA integrity number (RIN)  $\geq 6,9$  zur Sequenzierung verschickt.

Zur Auswertung der Sequenzierungsdaten erfolgte eine Aufbereitung der durch die Firma Novogene ermittelten Rohdaten durch Herrn Markus Glaß, Mitarbeiter der Core Facility Imaging der Martin-Luther-Universität Halle. Dazu wurden mithilfe der Software Cutadapt v1.14 Sequenzstücke von schlechter Qualität sowie verbliebene Teile von Sequenzieradaptoren entfernt. Die so prozessierten Sequenzdaten wurden unter Einsatz des Programms HiSat v2.1.0 (PMID: 25751142) für die mRNA-Daten, bzw. Bowtie2

v2.3.2 (PMID: 22388286) für die miRNA-Daten an das Mausgenom (UCSC mm10) aligniert. Das Entfernen von sekundären Alignments sowie das Filtern und Indizieren der Alignments wurde mit samtools v1.5 (PMID: 19505943) durchgeführt. Für die Zusammenfassung der kartierten Sequenzdaten wurde FeatureCounts v 1.53 (PMID: 24227677) genutzt. Als Annotationsbasis wurde für das Transkriptom-Profil Ensembl (GRCm38.79; PMID: 27899575) bzw. für das miRNA-Profil miRBase 22 (PMID: 21037258) verwendet. Die differentielle Expressionsanalyse wurde mit dem R-Softwarepaket edgeR v3.26.8 (PMID: 19910308) unter Verwendung der TMM-Normalisierung (engl. trimmed mean of M-values; PMID: 20196867) realisiert. Die normalisierten Daten wurden in FKPM (engl. fragments per million mapped reads) für das Transkriptom, bzw. CPM (engl. counts per million mapped reads) für die miRNAs transformiert. Die so aufbereiteten Sequenzierungsdaten wurden für jede Testgruppe hinsichtlich mRNA-Abundanz und Behandlungs-bedingter Änderungen der mRNA-Expression analysiert. Als Kriterien wurden Abundanz  $\geq 5$  Reads, mittlere Expressionsänderung  $> 1,5$ fach oder  $< 0,75$ fach und Cohen's  $d \geq 0,8$  oder  $\leq -0,8$  festgelegt. Für die miRNA-Abundanz und Behandlungs-bedingter Änderungen der miRNA-Expression wurden die Kriterien mit Abundanz  $\geq 500$  Reads, mittlere Expressionsänderung  $> 2$ fach oder  $< 0,5$ fach und Cohen's  $d \geq 0,8$  oder  $\leq -0,8$  festgelegt.

### **3.2.6 miRNA-Validierung: cDNA-Synthese**

Die Synthese komplementärer DNA (cDNA) erfolgte unter Verwendung des Qiagen miRCURY LNA RT Kits (Tabelle 3) nach Vorgaben des Herstellers. Hierzu wurde zunächst UniSp6 spike-in (= Positiv-Kontrolle) in Lösung gebracht. Anschließend wurde der Reverse-Transkriptase-MasterMix hergestellt. Hierzu wurden RNase-freies Wasser, 5fach-Reaktionspuffer, Enzym-Mix und UniSp6-Lösung im Verhältnis 9:4:2:1 vermischt. Des Weiteren wurden alle RNA-Proben auf eine Konzentration von 5 ng/ $\mu$ l eingestellt. Jeweils 4  $\mu$ l Probe wurden mit 16  $\mu$ l Mastermix versetzt. Die so vorbereiteten Proben-Master-Mix Gemische wurden dann im TProfessional Basic Gradient Thermocycler (Tabelle 1) bei 42 °C für 60 min und anschließend bei 95 °C für 5min sowie Abkühlung auf 4 °C inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur Verwendung bei -20 °C.

### **3.2.7 miRNA-Validierung: ddPCR**

Die Durchführung der ddPCR fand nach den Vorgaben des Herstellers statt. Den Analysen lag ein biologisches Replikat (N) von N=5 und ein technisches Replikat (n) von n=2

zu Grunde. Im ersten Schritt erfolgte für jede miRNA die Herstellung des ddPCR Master-Mix durch Zusammenführen von je 11 µl QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix (Tabelle 3) und 1,1 µl des jeweiligen Primers (Tabelle 4) in einem neuen Reaktionsgefäß. Danach wurden jeweils 12,1 µl ddPCR Master-Mix zu je 9,9 µl cDNA-Probe gegeben, das Gemisch anzentrifugiert und bei Raumtemperatur für 3 min inkubiert. Nach Einsetzen des DG8™ Cartridges (Tabelle 2) in den Bio Rad DG8 Cartridge Holder (Tabelle 1) wurden je 20 µl cDNA-Master-Mix-Gemisch in die Proben-Wells sowie 70 µl QX200™ Droplet Generation Oil for EvaGreen (Tabelle 3) in die Öl-Wells pipettiert, rasch mit dem DG8™ Gasket abgedeckt (Tabelle 2) und zur Tröpfchenherstellung in den QX200™ Droplet Generator (Tabelle 1) gegeben. Nachfolgend wurden je 40 µl Proben-Tröpfchen-Gemisch in eine 96-Well-Platte überführt, die abschließend mit Hilfe der PCR Plate Heat Seal, foil, pierceable (Tabelle 2) im PX1 PCR Plate Sealer (Tabelle 1) (für 3 s) versiegelt wurde. Die versiegelte 96-Well-Platte wurde in den T100™ Thermocycler (Tabelle 1) gegeben und das ddPCR-Programm gestartet. Dieses Programm umfasste 3 Arbeitsphasen: zunächst die Polymerase-Aktivierung und die Denaturierung bei 95 °C für 5 min, gefolgt von 40 Zyklen Amplifizierung bei abwechselnd 95 °C für 30 s und 58 °C für 1 min unter Verwendung einer Temperaturanstiegs- bzw. abfallsrate von 1,6 °C pro Minute und zuletzt der Stabilisierung des Färbemittels bei 4 °C für 5 min, dann 90 °C für 5 min sowie Halten der Temperatur bei 4 °C. Daraufhin wurden die Proben unter Verwendung des QX200™ Droplet Reader (Tabelle 1) vermessen. Für jede Probe gab das Gerät die Kopien/µl Reaktionsansatz aus. Dieser Wert wurde unter Verwendung der Formel:

$$\text{Kopien}[n]/\mu\text{l Tröpfchen} \times 2,2^x \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{20\mu\text{l cDNA}}{20\text{ng RNA}} = \text{Kopien } [n]/\text{ng RNA}$$

in die Anzahl Kopien pro Nanogramm RNA umgerechnet.

Zur Erzielung einer optimalen Messgenauigkeit der ddPCR, wurde die cDNA verdünnt eingesetzt. Hintergrund sind Analysen der Arbeitsgruppe, welche gezeigt haben, dass die Validität der ddPCR bei Messwerten von ca. 100 positiven Signalen besonders hoch ist (Kuhlmann et al. 2021). Um die ideale Verdünnung der cDNA für jede analysierte miRNA zu eruieren, wurden Verdünnungsreihen mit Verdünnungen von 1:25, 1:50, 1:100, 1:250 sowie 1:500 angesetzt und die gemessenen Reads für die jeweilige Verdünnungsstufe ermittelt. Als Verdünnungsmedium wurde RNase-freies Wasser verwendet.

### 3.2.8 *In silico*-Analyse für PCR-validierte miRNAs

Zur Identifizierung von Zielgenen der verändert exprimierten miRNAs wurde die Datenbank miRWalk 2.0 (Tabelle 6) herangezogen. Es wurden sowohl bereits validierte als auch auf Grund von Sequenzanalogien vermutete Zielgene dieser miRNAs ermittelt. Die erhaltene Zielgenliste wurde zum einen mit den durch Sequenzierung ermittelten messenger RNA (mRNA) -Expressionsprofilen (Transkriptom) der Zellen abgeglichen. Zum anderen waren die identifizierten validierten und putativen Zielgene Ausgangspunkt für weiterführende *in silico*-Analysen.

Unter Verwendung der Datenbank ClueGO, Version 2.5.7 (Tabelle 6) wurde eine Clusteranalyse der Zielgene verändert exprimierter miRNAs durchgeführt. Vorgegeben wurden folgende Einstellungen: Analysemodus „Funktional Analysis“, Spezies „*Mus Musculus*“, Ontologie „Biological Process“. Zudem wurden die Statistik-Optionen  $p \leq 0,05$  bei Verwendung eines zweiseitigen hypergeometrischen Tests und einer p-Wert-Korrektur nach Benjamini-Hochberg ausgewählt. Die ermittelten Gen-Ontologie (engl. gene ontology, GO) -Begriffe wurden hinsichtlich des Vorkommens Makrophagen-spezifischer Prozesse, wie Zytokinsynthese, oxidativer Burst, Phagozytose, Antigen-Abtötung, Antigen-Präsentation, Apoptose, TLR1/2/6-Signalkaskade und Immunmodulation geprüft.

Mit Hilfe der Datenbank GeneCards Version 5.1.0 Build 379 (Tabelle 6) wurden alle Transkriptionsfaktoren identifiziert, die die Expression der experimentell validierten miRNAs beeinflussen. Diese wurden dann mit den durch TLR-Stimulation aktivierten Transkriptionsfaktoren abgeglichen.

### 3.2.9 *In silico*-Analyse des Transkriptoms

Die per Sequenzierung erhaltenen mRNA-Expressionsdaten wurden für eine Gen-Set-Anreicherungsanalyse (engl. gene set enrichment analysis, GSEA) herangezogen. Die Durchführung der GSEA erfolgte durch Herrn Markus Glaß, Mitarbeiter der Core Facility Imaging der Martin-Luther-Universität Halle. Die Gen-Set-Anreicherungsanalyse wurde mit Hilfe der Software GSEA v3.0 (PMID: 16199517) und dem Gen-Set MSigDB v7.0 (PMID: 26771021) durchgeführt. Angewendet wurden dabei die Methoden „pre-ranked test“, „1000 permutations“ sowie „classical scoring scheme“. Als Ausgangsdaten wurden die zur Basis 2 logarithmierte Änderungen der Expression proteinkodierender Gene verwendet, die zuvor durch die differenziellen Expressionsanalysen bestimmt wurden. Auf diese Weise wurde ermittelt, ob bestimmte a priori definierte Gruppen von Genen, wel-

che mit spezifischen biologischen Prozessen assoziiert sind, statistisch signifikante und übereinstimmende Unterschiede zwischen zwei Behandlungsgruppen aufweisen. Der Fokus lag auf Makrophagen-typischen Prozessen, wie Zytokinsynthese, oxidativer Burst, Phagozytose, Antigen-Abtötung Antigen-Präsentation, Apoptose, TLR1/2/6-Signalkaskade und Immunmodulation.

Unter Verwendung der KEGG Pathway Database Release 98.0 (Tabelle 6) wurden zunächst alle durch TLR-Stimulation aktivierten Transkriptionsfaktoren identifiziert. Die mRNA-Expressionsdaten wurden dann auf eine veränderte Expression dieser Transkriptionsfaktoren geprüft.

### **3.2.10 Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism, Version 9 (Tabelle 6) durchgeführt. Für die Prüfung auf Stimulationseffekt wurde ein ungepaarter t-Test mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  genutzt. Für die Prüfung auf Supplementierungseffekte wurde eine Einweg-Varianzanalyse (engl. one-way analysis of variance, one-way ANOVA) mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  herangezogen. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels Box-Whisker-Plot, welcher den Median, das untere und obere Quartil sowie das Minimum und Maximum der Messwerte angibt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Sequenzierung

Es wurden 4 Testgruppen untersucht: unstimulierte und un-supplementierte Makrophagen („Kontrolle“), LTA-stimulierte Makrophagen („LTA“), AA-supplementierte und LTA-stimulierte Makrophagen („LTA + AA“) sowie DHA-supplementierte und LTA-stimulierte Makrophagen („LTA + DHA“) (Tabelle 5). Die Sequenzierungsanalyse umfasste sowohl das Transkriptom als auch das miRNA-Profil der jeweiligen Testgruppe.

#### 4.1.1 Transkriptom

Mittels NGS wurden in den untersuchten Testgruppen zwischen 14221 und 15207 verschiedene mRNAs identifiziert (Tabelle 7). Entsprechend stand für die nachfolgende GSEA (siehe Kapitel 4.3.1) eine solide Datenbasis zur Verfügung.

**Tabelle 7:** Anzahl identifizierter mRNAs nach Testgruppe

Testgruppe	Anzahl identifizierter mRNAs
Kontrolle	15063
LTA	14882
LTA + AA	14221
LTA + DHA	15207

Ferner wurde nach verändert exprimierten mRNAs gescreent unter Anwendung folgender Kriterien: Abundanz  $\geq 5$  Reads, mittlere Expressionsänderung  $> 1,5$ fach oder  $< 0,75$ fach und Cohen`s d  $\geq 0,8$  oder  $\leq -0,8$ . Beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe LTA-stimulierter Zellen erfüllten 3810 mRNAs die genannten Kriterien. Der Vergleich LTA-stimulierter Zellen mit Zellen, welche zusätzlich zur LTA-Stimulation mit PUFA supplementiert worden waren, ergab 2752 mRNAs (LTA vs. LTA + AA) bzw. 3095 mRNAs (LTA vs. LTA + DHA), welche die Kriterien für Abundanz, mittlere Expressionsänderung und Cohen`s d erfüllten.

Die nach gram-positiver Stimulation verändert exprimierten mRNAs wurden auf immunologisch relevante Genprodukte durchsucht. Dies ergab 34 Treffer (Tabelle 8). So wurde eine Aufregulation von Genen proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6 und

TNF- $\alpha$  nachgewiesen (Tabelle 8). SOD1, ein Enzym welches die Makrophagen vor den schädlichen Einfluss von ROS im Rahmen der Immunabwehr schützt, war ebenfalls in seiner Expression gesteigert (Tabelle 8). Hingegen zeigte sich das Gen LYZ, welches für Lysozym, ein hydrolytisches Enzym das bakterielle Zellwände abbaut, kodiert, vermindert exprimiert (Tabelle 8). Ein weiterer Teil der verändert exprimierten Gene sind dem Prozess der Apoptose zuzuordnen (Tabelle 8). Zu den aufregulierten Genen zählten BAD, BAK1 und BAX, welchen eine proapoptotische Wirkung in Makrophagen zugesprochen wird, während die Gene der Caspasen 3 und 7 vermindert exprimiert waren. Darüber hinaus wurden Mediatoren der TLR-Signalkaskade als verändert exprimiert aufgedeckt (Tabelle 8). Unter anderem war die Expression der Gene TLR2, MYD88, LY96 sowie der NF $\kappa$ B-Inhibitoren alpha und beta gesteigert. Auffällig war außerdem eine veränderte Expression von Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Hierbei war die Expression von ATF4, CEBPB, JUNB und NF $\kappa$ B2 gesteigert, während sich die Expression von CREB1, BCL6, FOSL2, NFATC1 und NFATC3 vermindert zeigte (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Übersicht verändert exprimierter Gene nach gram-positiver Stimulation

<b>Gen</b>	<b>Abundanz Kontrolle (Mittelwert)</b>	<b>Abundanz LTA (Mittelwert)</b>	<b>mittlere Expressions-änderung</b>	<b>Cohen`s d</b>
AKT3	20,6	8,7	0,4	4,4
APAF1	7,0	3,8	0,5	1,9
ATF4	398,1	702,7	1,8	-2,1
BAD	9,3	14,9	1,6	-1,2
BAK1	60,6	124,5	2,1	-2,9
BAX	189,3	542,2	2,9	-1,7
BCL2	8,6	3,6	0,4	3,9
BCL6	6,4	2,2	0,3	10,0
CASP3	32,1	18,9	0,6	1,2
CASP7	17,4	12,9	0,7	2,1
CEBPB	105,6	178,1	1,7	-2,7
CREB1	8,4	4,9	0,6	2,7
FOSL2	13,7	6,4	0,5	2,6
IL6	1,3	56,4	43,2	-3,6
IRAK1	22,2	16,4	0,7	2,2
JUNB	81,3	227,8	2,8	-5,1
LY96	4,4	12,5	2,9	-3,3
LYZ	509,9	309,3	0,6	2,8
MAPK14	43,7	24,7	0,6	5,8

**Tabelle 8:** Übersicht verändert exprimierter Gene nach gram-positiver Stimulation (Fortsetzung)

Gen	Abundanz Kontrolle (Mittelwert)	Abundanz LTA (Mittelwert)	mittlere Expressions-änderung	Cohen`s d
MYD88	16,2	31,2	1,9	-2,8
NFATC1	5,4	1,9	0,4	5,8
NFATC3	13,7	8,6	0,6	1,8
NFKB2	69,4	106,4	1,5	-3,9
NFKBIA	61,4	126,7	2,1	-5,1
NFKBIB	19,7	88,1	4,5	-2,8
RIPK1	6,0	3,5	0,6	2,4
ROCK1	15,1	9,3	0,6	1,3
ROCK2	17,9	9,6	0,5	1,9
SOD1	163,8	479,4	2,9	-1,4
TBK1	31,0	20,9	0,7	1,7
TICAM1	5,7	9,5	1,7	-5,9
TIRAP	7,4	5,3	0,7	0,9
TLR2	81,7	146,3	1,8	-6,8
TNF	53,3	146,8	2,8	-19,3

AKT3 = AKT Serin/Threonin-Kinase 3, APAF1 = Apoptotischer Peptidase-Aktivierungsfaktor 1, ATF4 = aktivierender Transkriptionsfaktor 4, BAD = BCL2-assoziiertes Agonist des Zelltodes, BAK1 = BCL2-Antagonist/Killer 1, BAX = BCL2-assoziiertes X-Protein, BCL = B-Zell Lymphom, CASP = Caspase, CEBPB = CCAAT-Enhancer-Bindungsprotein  $\beta$ , CREB1 = cAMP-responsive Element-Bindungsprotein 1, FOSL = Fos-ähnlich, IL6 = Interleukin 6, IRAK = Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase, JUN = Jun Proto-onkogen, LYZ = Lysozym, LY96 = Lymphozyten Antigen-96, MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase, MYD88 = Myeloides Differenzierungsprotein 88, NFATC = Kernfaktor der aktivierten T-Zellen, NFKB2 = NF $\kappa$ B-Untereinheit 2, NFKBIA = NF $\kappa$ B-Inhibitor alpha, NFKBIB = NF $\kappa$ B-Inhibitor beta, RIPK1 = Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Kinase 1, ROCK = Rho-assoziierte, Coiled-Coil-haltige Proteinkinase, SOD1 = Superoxid-Dismutase 1, TBK1 = TANK-bindende Kinase 1, TICAM1 = TIR-Domäne enthaltendes Adapter-Molekül 1, TIRAP = TIR-Domäne-enthaltendes Adapterprotein, TLR = Toll-artiger Rezeptor, TNF = Tumornekrosefaktor-alpha

#### 4.1.2 miRNA-Profil

Mittels NGS wurden in den untersuchten Testgruppen zwischen 1200 und 1241 verschiedene miRNAs identifiziert (Tabelle 9).



**Tabelle 9:** Anzahl identifizierter miRNAs nach Testgruppe

Testgruppe	Anzahl identifizierter miRNAs
Kontrolle	1241
LTA	1200
LTA + AA	1235
LTA + DHA	1207

Das Screening nach verändert exprimierten miRNAs unter Anwendung der Kriterien Abundanz  $\geq 100$  Reads, mittlere Expressionsänderung  $> 1,5$ fach oder  $< 0,75$ fach und Cohen`s d  $\geq 0,8$  oder  $\leq -0,8$  erbrachte beim Vergleich LTA-stimulierter Zellen mit der Kontrollgruppe 79 miRNAs. Vor dem Hintergrund dieser großen Anzahl an Validierungskandidaten wurden folgende, verschärfte Kriterien festgelegt: Abundanz  $\geq 500$  Reads, mittlere Expressionsänderung  $> 2$ fach oder  $< 0,5$ fach und Cohens`d  $\geq 0,8$  oder  $\leq -0,8$ . Diese Kriterien wurden beim Vergleich LTA-stimulierter versus unstimulierter Zellen von 19 miRNAs erfüllt (Tabelle 10). Jede dieser miRNAs zeigte in Folge der LTA-Stimulation entweder eine Verdopplung der Abundanz auf einen Wert  $\geq 500$  Reads oder wies unter Kontrollbedingungen eine Abundanz  $\geq 500$  Reads auf, welche nach Stimulation mindestens halbiert wurde. Alle in Tabelle 10 gelisteten miRNAs wurden als Kandidaten für die experimentelle Validierung eines Stimulationseffektes festgelegt.

Beim Vergleich LTA-stimulierter Zellen mit Zellen, welche zusätzlich zur LTA-Stimulation mit PUFA supplementiert worden waren, ergaben sich beim Anlegen der verschärften Kriterien 26 miRNAs (LTA vs. LTA + AA) bzw. 30 miRNAs (LTA vs. LTA + DHA). Der Abgleich dieser miRNAs mit den 19 Validierungskandidaten für einen Stimulationseffekt zeigte in mehreren Fällen Übereinstimmungen. Die NGS-Daten indizierten einen potentiellen Effekt bei 6 der 19 miRNAs in Folge einer Supplementierung mit AA und bei 11 der 19 miRNAs in Folge der Supplementierung mit DHA (Tabelle 10). Die experimentelle Überprüfung dieser Daten erfolgte mit Hilfe der ddPCR.

**Tabelle 10:** miRNA Validierungskandidaten

miRNA	Stimulationseffekt durch LTA	Fettsäureeffekt durch AA	Fettsäureeffekt durch DHA
let-7a-5p	X	X	X
miR-7a-5p	X	-	X
miR-15b-5p	X	-	X
miR-16-1-3p	X	X	-
miR-16-5p	X	-	-
miR-21a-5p	X	-	X

**Tabelle 10:** miRNA Validierungskandidaten (Fortsetzung)

miRNA	Stimulationseffekt durch LTA	Fettsäureeffekt durch AA	Fettsäureeffekt durch DHA
miR-100-5p	X		-
miR-101a-3p	X	X	X
miR-101b-3p	X	X	X
miR-148a-3p	X	-	X
miR-151-3p	X	-	X
miR-155-5p	X	X	-
miR-186-5p	X	-	-
miR-340-5p	X	-	X
miR-351-5p	X	-	-
miR-425-5p	X	-	X
miR-615-3p	X	X	-
miR-1198-5p	X	-	X
miR-3535	X	-	-

„X“ = Kriterien für veränderte Expression erfüllt (Abundanz  $\geq 500$  Reads, mittlere Expressionsänderung  $> 2$ fach oder  $< 0,5$ fach und Cohens`d  $\geq 0,8$  oder  $\leq -0,8$ )

„-“ = Kriterien für veränderte Expression nicht erfüllt

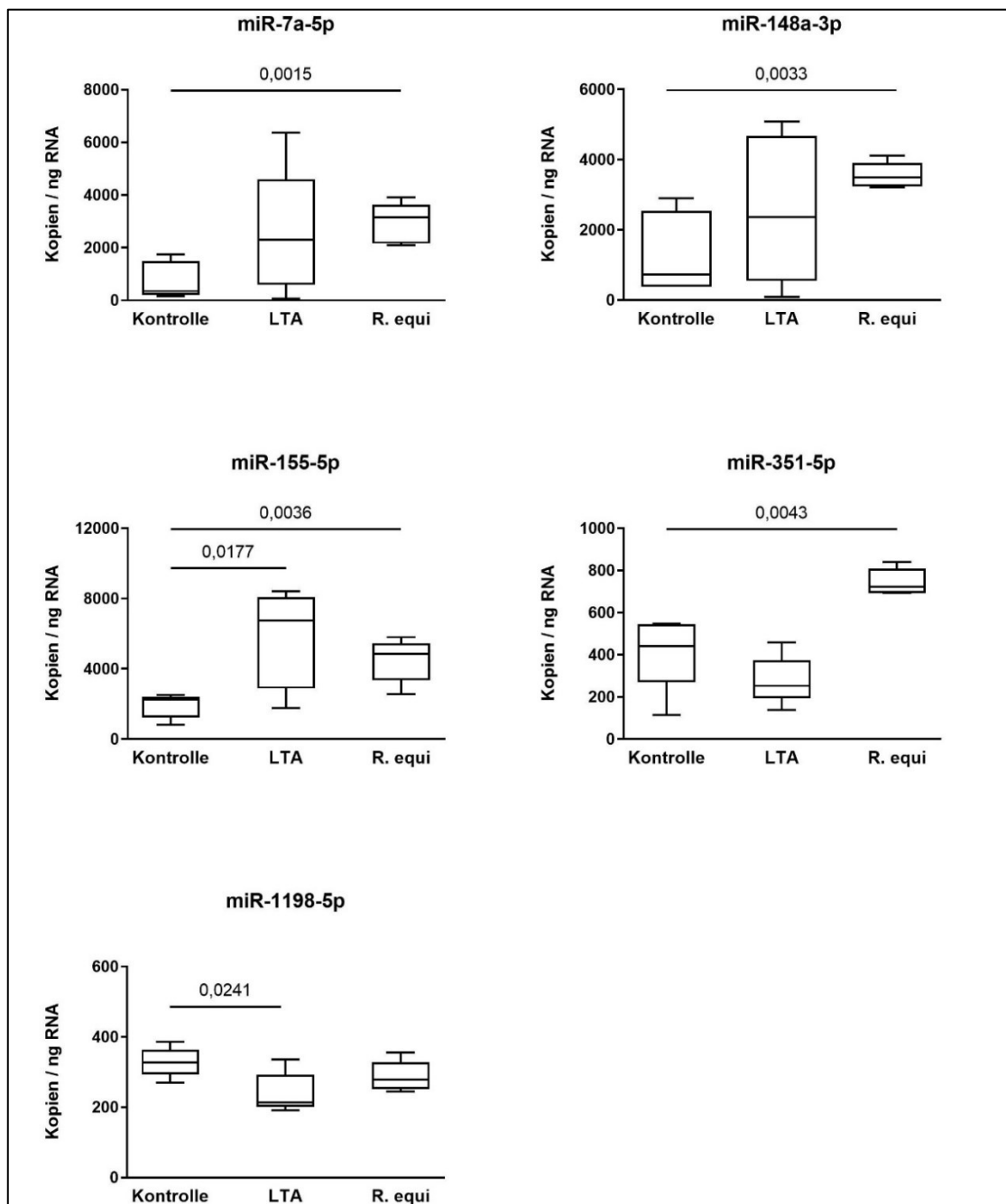
## 4.2 ddPCR

### 4.2.1 Experimentelle Validierung Stimulations-induzierter Expressionsveränderungen von miRNAs

Auf der Grundlage der Daten aus dem miRNA-Screening erfolgte für die 19 in Tabelle 10 benannten miRNA-Validierungskandidaten eine vergleichende Analyse der Kopienzahl mittels ddPCR. Insgesamt wurde für 5 dieser miRNAs eine Stimulations-induzierte Expressionsveränderung bestätigt. Die validierten miRNAs waren miR-7a-5p, miR-148a-3p, miR-155-5p, miR-351-5p und miR-1198-5p. Bei den miRNAs miR-7a-5p, miR-148a-3p, miR-155-5p und miR-351-5p war in Folge einer gram-positiven Stimulation eine Aufregulation zu beobachten, wohingegen es bei der miRNA miR-1198-5p zu einer Herunterregulation kam (Abbildung 2). Für die miRNAs miR-7a-5p, miR-148a-3p und miR-351-5p zeigte sich zudem eine stärker ausgeprägte Wirkung der Ko-Kultur der Makrophagen mit dem lebenden gram-positiven Erreger *R. equi* im Vergleich zur Stimulation mit LTA (Abbildung 2). Die stärkste Aufregulation bei Ko-Kultivierung mit *R. equi* wurde für miR-7a-5p gemessen, deren Kopienzahl um das 4,0fache anstieg. Für miR-148a-3p wurde

eine Steigerung der Kopienzahl um das 2,7fache, für miR-155-5 um das 2,4fache und für miR-351-5p um das 1,8fache ermittelt. Die Kopienzahl von miR-1198-5p sank in Gegenwart von *R. equi* um den Faktor 0,9.

Die miRNAs miR-21a-5p, miR-100-5p, miR-151-3p, miR-16-1-3p, miR-186-5p, miR-340-5p und miR-3535 waren in der ddPCR experimentell nicht nachweisbar. Die miRNAs let-7a-5p, miR-101a-3p, miR-101b-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-425-5p und miR-615-3p waren experimentell nachweisbar, jedoch wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Testgruppen beobachtet.



**Abbildung 2:** miRNA-Expression in RAW264.7 nach gram-positiver Stimulation

#### 4.2.2 Experimentelle Validierung PUFA-induzierter Expressionsveränderungen von miRNAs

Die Anreicherung der Makrophagen mit der Fettsäure AA bewirkte bei den miRNAs miR-7a-5p und miR-155-5p eine signifikante Steigerung des Stimulationseffektes (Abbildung 3). So war bei der miRNA miR-7a-7p die Expression um 2,2fache und bei der miRNA miR-155-5p um das 2,0fache nach Anreicherung mit AA gesteigert.

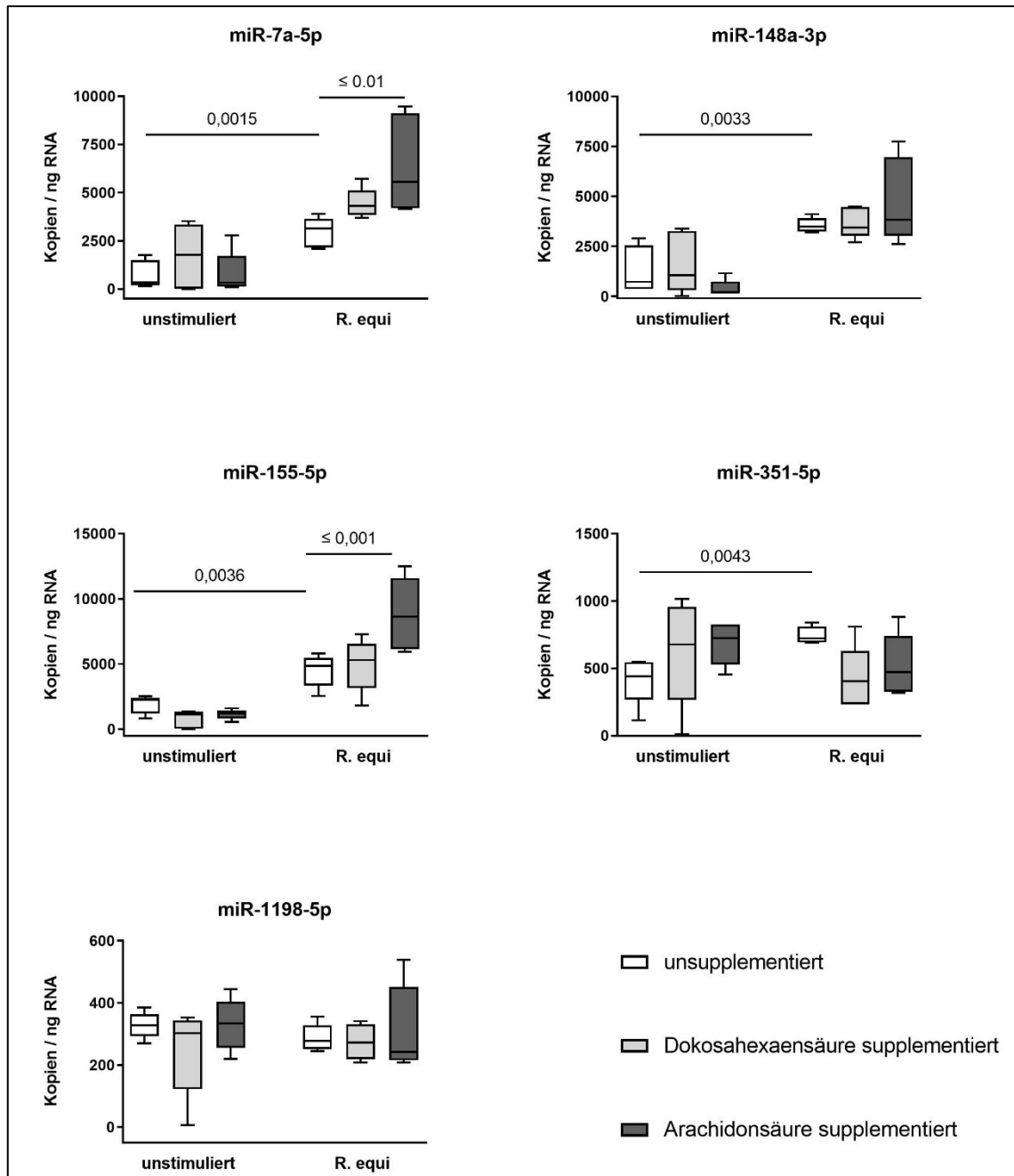


Abbildung 3: miRNA-Expression nach PUFA-Supplementierung und Stimulation

Im Gegensatz dazu wirkte sich eine Supplementierung mit der Fettsäure DHA nicht auf das Expressionsniveau von miR-7a-5p und miR-155-5p aus (Abbildung 3). Für die miRNAs miR-148a-3p, miR-351-5p und miR-1198-5p wurde unabhängig von der getesteten Fettsäure kein Supplementierungseffekt beobachtet (Abbildung 3).

### 4.3 *In silico*-Analyse

#### 4.3.1 GSEA des Transkriptoms

Die GSEA zeigt unter Verwendung vordefinierter Gruppen von Genen, die mit spezifischen biologischen Prozessen assoziiert sind, statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Behandlungsgruppen auf. Mit Hilfe dieser Analyse wurden die Transkriptomprofile von unstimulierten und gram-positiv stimulierten Makrophagen verglichen. Hierbei wurden 29 signifikant ( $FDR < 0,05$ ) veränderte Gen-Datensätze in 6 Kategorien mit Assoziation zur M1-Differenzierung und Makrophagenfunktion identifiziert (Tabelle 11). Hervorzuheben ist eine positive Anreicherung der Gen-Datensätze GO:0002237 (Reaktion auf Moleküle bakteriellen Ursprungs), GO:0002220 (angeborene Immunantwort, die einen Zelloberflächenrezeptor-Signalweg aktiviert), GO:0038061 (NIK/NF- $\kappa$ B-Signalisierung), GO:0045087 (angeborene Immunantwort) und GO:0002263 (Zellaktivierung, die an der Immunantwort beteiligt ist) (Abbildung 4). Eine Anreicherung identischer Gen-Datensätze konnte bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe im gram-negativen Milieu nachgewiesen werden (Riechert et al. 2022). Dies bestätigt, dass es nach der Erkennung von gram-positiven und gram-negativen Bakterien zu einer Reihe gleichgerichteter Veränderungen auf mRNA-Ebene kommt, welche letztlich die Differenzierung zum M1-Phänotyp begünstigen.

**Tabelle 11:** Übersicht signifikant veränderter Gen-Datensätze laut GSEA

Kategorie	Anreicherung	Name	FDR
Curated	positiv	Reactome_infektiöse Krankheit	0,000000
		Reactome_angeborenes Immunsystem	0,000000
		Reactome_ROS und RNS-Produktion in Phagozyten	0,000752
		KEGG_Antigen Prozessierung und Präsentation	0,001568
		Dutta_Apoptose durch NF $\kappa$ B	0,008207
GO	positiv	GO_Antigenverarbeitung und Präsentation von Peptidantigenen	0,000000

**Tabelle 11:** Übersicht signifikant veränderter Gen-Datensätze laut GSEA  
(Fortsetzung)

Kategorie	Anreicherung	Name	FDR
		GO_Antigen Prozessierung und Präsentation	0,000000
		GO_angeborene Immunantwort	0,000004
		GO_Zellaktivierung, die an der Immunantwort beteiligt ist	0,000467
		GO_NIK/ NFκB-Signalisierung	0,000008
		GO_angeborene Immunantwort, die einen Zelloberflächenrezeptor-Signalweg aktiviert	0,000023
		GO_positive Regulation der Abwehrreaktion	0,000996
		GO_Aktivierung der angeborenen Immunantwort	0,001178
		GO_Regulation der angeborenen Immunantwort	0,001272
		GO_Reaktion auf Moleküle bakteriellen Ursprungs	0,001628
		GO_Abwehrreaktion	0,004388
		GO_Chemokinaktivität	0,005155
		GO_Tumornekrosefaktor-Superfamilie Zytokinproduktion	0,006030
		GO_Monozyten Chemotaxis	0,006164
		GO_Regulation der Abwehrreaktion	0,009239
		GO_Antigenrezeptor-vermittelter Signalweg	0,022062
		GO_positive Regulation der Zytokinproduktion	0,024217
Hallmarks	positiv	Hallmark_Entzündungsantwort	0,000102
		Hallmark_Apoptose	0,037625
Immuno-logic	positiv	GSE5099_Monozyt vs. klassischer M1-Makrophage herunterreguliert	0,000063
		GSE8921_unstimuliert vs. TLR 1/2 für 24 h stimulierter Monozyt herunterreguliert	0,010831
Immuno-logic	negativ	GSE8921_0 h unstimuliert vs. TLR 1/2 für 24 h stimulierter Monozyt herunterreguliert	0,000004
		GSE8921_unstimuliert vs. TLR 1/2 für 24 h stimulierter Monozyt aufreguliert	0,047367
KEGG	positiv	KEGG_Antigen Prozessierung und Präsentation	0,002842

FDR = Falscherkennungsrate

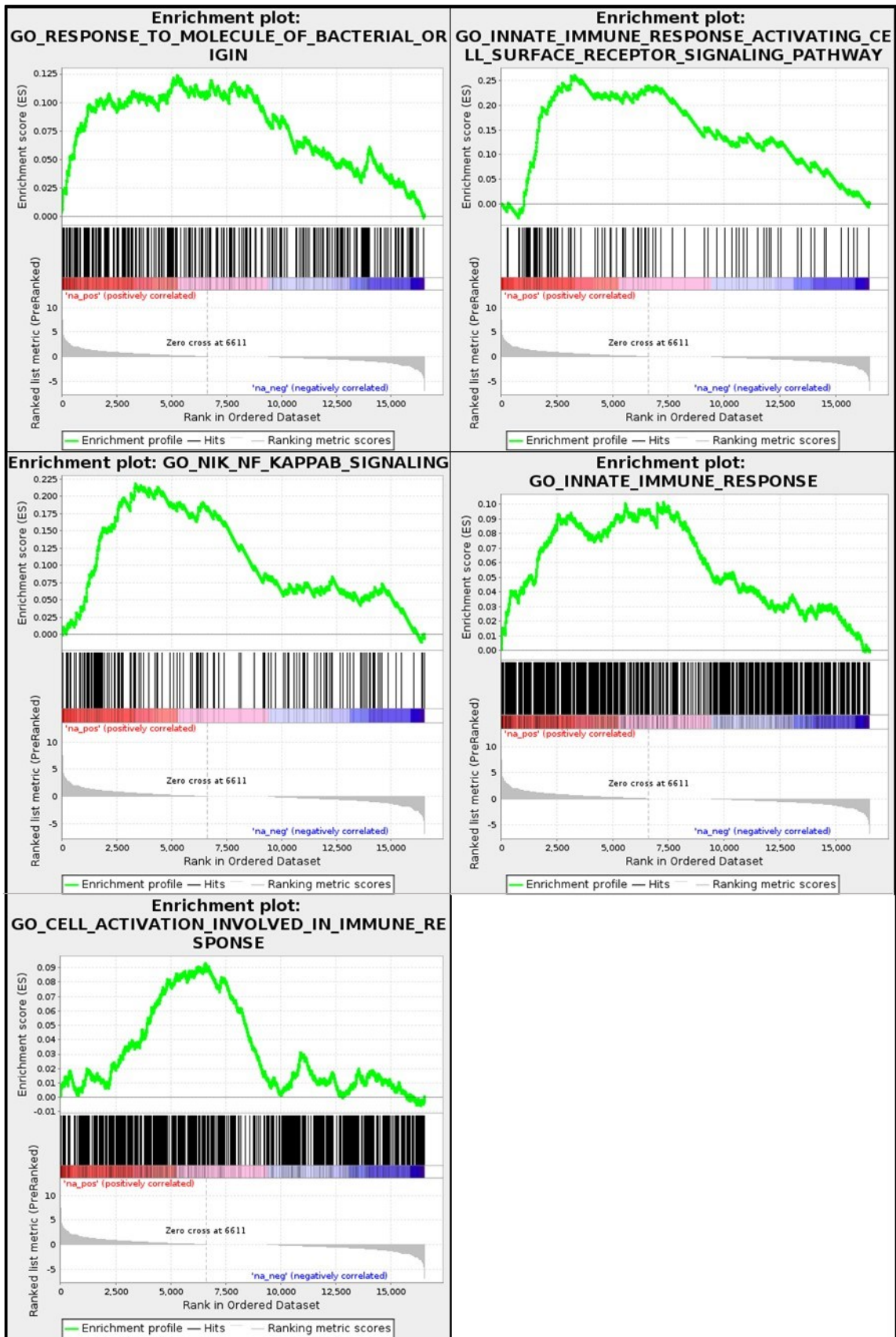


Abbildung 4: Anreicherungsplots angereicherter Gen-Datensätze

### 4.3.2 TLR-assoziierte Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf die Expression der experimentell validierten miRNAs

Die Expression von miRNAs unterliegt der Regulation durch spezifische Transkriptionsfaktoren. Daher wurden mittels Screening der Datenbank GeneCards, Version 5.1.0 Build 379 sämtliche Transkriptionsfaktoren identifiziert, welche die Expression der miRNAs miR-7a-5p, miR-148a-3p, miR-155-5p, miR-351-5p und miR-1198-5p beeinflussen. Im Anschluss wurde ein Abgleich mit den laut Datenbank KEGG Pathway Database, Release 98.0 TLR-assoziierten Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Im Ergebnis wurden für 3 der 5 validierten miRNAs Transkriptionsfaktoren registriert, welche beide Kriterien erfüllten (Tabelle 12). Für miR-7a-5p wurden 10 Transkriptionsfaktoren, für miR-148a-3p ebenfalls 10 Transkriptionsfaktoren und für miR-155-5p 4 Transkriptionsfaktoren identifiziert, welche mit dem TLR-Signalweg verknüpft sind und zugleich auf die betreffenden miRNA-Gene einwirken können (Tabelle 12). Bemerkenswerterweise stellen diese Transkriptionsfaktoren entweder Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1 dar, wie FOS, FOSL2, JUN, JUNB und JUND, oder interagieren mit diesem Transkriptionsfaktor. Zu diesen mit AP-1 in Wechselwirkung stehenden Transkriptionsfaktoren gehören ATF4, NFATC1 und NFATC3, welche mit AP-1 zusammenarbeiten, die Transkriptionsfaktoren BCL6 und BCL6B, die eine Unterdrückung der AP-1-Aktivität vermitteln sowie die Transkriptionsfaktoren MAX und MYC, deren Expression von AP-1 beeinflusst wird.

Die Ergebnisse der *in silico*-Analyse liefern einen klaren Hinweis darauf, dass die Aufregulation von miR-7a-5p, miR-148a-3p und miR-155-5p nach gram-positiver TLR-Stimulation durch AP-1 vermittelt wird. Untermuert wird dieser Befund durch die Ergebnisse der NGS-Analyse des Transkriptom. Wie in Kapitel 4.1.1 ausgeführt, indizieren die NGS-Daten eine veränderte Expression von Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie in Folge gram-positiver Stimulation. So war die AP-1 Untereinheit JUNB um das 2,8fache aufreguliert (Tabelle 8). Ferner zeigte ATF4 eine Steigerung der Expression um das 1,8fache, während sich die Expression von BCL6 als Inhibitor der AP-1 Aktivität deutlich reduzierte (Tabelle 8). Weitere laut NGS in der Expression verminderte Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familien waren FOSL2, NFATC1 und NFATC3 (Tabelle 8).

**Tabelle 12:** TLR-assoziierte Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf validierte miRNAs

Transkriptionsfaktor	miR-7a-5p	miR-148a-3p	miR-155-5p
ATF4	-	X	-



**Tabelle 12:** TLR-assoziierte Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf validierte miRNAs (Fortsetzung)

Transkriptionsfaktor	miR-7a-5p	miR-148a-3p	miR-155-5p
BCL6	X	X	-
BCL6B	X	-	-
ELK1	-	-	-
FOS	X	X	-
FOSL2	X	X	-
JUN	-	X	-
JUNB	X	X	X
JUND	X	X	X
MAX	X	X	X
MYC	X	X	-
NFATC1	X	X	X
NFATC3	X	-	-

„X“ = Transkriptionsfaktor bindet an Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle der miRNA  
 „-“ = Transkriptionsfaktor bindet nicht an Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle der miRNA  
 ATF4 = aktivierender Transkriptionsfaktor 4, BCL = B-Zell Lymphom, ELK1 = ETS-ähnliches Protein-1, Fos = FOS Protoonkogen, FOSL = Fos-ähnlich, JUN = Jun Protoonkogen, MAX = Myc-assoziiertes Faktor X, MYC = Myc Protoonkogen, NFATC = Kernfaktor der aktivierten T-Zellen

#### 4.3.3 Untersuchung der potenziell durch die verändert exprimierten miRNAs beeinflussten Prozesse

Unter Verwendung der Datenbank ClueGO, Version 2.5.7 wurde eine Clusteranalyse der mittels miRWalk identifizierten putativen und experimentell validierten Zielgene der verändert exprimierten miRNAs durchgeführt. Diese erbrachte für 4 der 5 validierten miRNAs eine Assoziation mit M1-Differenzierung und Immunabwehr (Tabelle 13). Insgesamt wurden 51 signifikant gebündelte GO-Begriffe ( $p > 0,05$ ) ermittelt, wobei 35 der 51 identifizierten GO-Begriffe auf die miRNA miR-155-5p zurückzuführen waren. Die detektierten biologischen Prozesse ließen sich 5 Oberkategorien zuordnen: GO:0048583 (Regulation der Reaktion auf Stimuli), GO:0023051 (Regulation der Signalisierung), GO:0009966 (Regulation der Signaltransduktion), GO:0010468 (Regulation der Genexpression) und GO:0045595 (Regulation der Zelldifferenzierung). Dies ist ein manifester Hinweis darauf, dass die nach der Stimulation mit gram-positiven Bakterien beobach-

teten Veränderungen des Transkriptom im Sinne einer M1-Differenzierung im Zusammenhang mit der beobachteten Aufregulation der miRNAs miR-7a-5p, miR-148a-3p, miR-155-5p und miR-351-5p stehen.

**Tabelle 13:** Clusteranalyse auf Basis der Zielgene verändert exprimierter miRNAs

<b>miRNA</b>	<b>GO-Begriffe</b>
miR-7a-5p	GO:0002478 – Antigenverarbeitung und Präsentation von exogenem Peptidantigen
	GO:0002495 – Antigenverarbeitung und Präsentation von Peptidantigenen über MHC-Klasse II
	GO:0002504 – Antigenverarbeitung und Präsentation von Peptid- oder Polysaccharid-Antigenen über MHC-Klasse II
	GO:0019884 – Antigenverarbeitung und Präsentation von exogenem Antigen
	GO:0019886 – Antigenverarbeitung und -präsentation von exogenen Peptidantigenen über MHC-Klasse II
	GO:0048002 – Antigenverarbeitung und -präsentation von Peptidantigenen
	GO:0072593 – Stoffwechselprozess der reaktiven Sauerstoffspezies
	GO:0090195 – Chemokinsekretion
	GO:0090196 – Regulation der Chemokinsekretion
	GO:2000377 – Regulation des Stoffwechselprozesses der reaktiven Sauerstoffspezies
miR-148a-3p	GO:0002688 – Regulation der Leukozyten Chemotaxis
	GO:0030595 – Leukozyten Chemotaxis
miR-155-5p	GO:0002237 – Reaktion auf Moleküle bakteriellen Ursprungs
	GO:0002573 – Differenzierung der myeloischen Leukozyten
	GO:0002683 – negative Regulation von Prozessen des Immunsystems
	GO:0002691 – Regulation der zellulären Extravasation
	GO:0002761 – Regulation der Differenzierung myeloischer Leukozyten
	GO:0002762 – negative Regulation der myeloischen Leukozytendifferenzierung
	GO:0002763 – positive Regulation der myeloischen Leukozytendifferenzierung
	GO:0004517 – Stickstoffmonoxid-Synthase-Aktivität
	GO:0007249 – I $\kappa$ B Kinase/ NF $\kappa$ B Signalisierung
	GO:0030099 – Differenzierung der myeloischen Zellen
	GO:0030225 – Makrophagendifferenzierung
	GO:0031347 – Regulation der Abwehrreaktion
	GO:0031349 – positive Regulation der Abwehrreaktion
	GO:0043030 – Regulation der Makrophagenaktivierung
	GO:0043065 – positive Regulation des Apoptoseprozesses

**Tabelle 13:** Clusteranalyse auf Basis der Zielgene verändert exprimierter miRNAs (Fortsetzung)

miRNA	GO-Begriffe
	GO:0043122 – Regulation der IκB Kinase/ NFκB Signalisierung
	GO:0043123 – positive Regulation der IκB/ NFκB- Signalübertragung
	GO:0043124 – negative Regulation der IκB/ NFκB-Signalübertragung
	GO:0045637 – Regulation der myeloischen Zelldifferenzierung
	GO:0045638 – negative Regulation der myeloischen Zelldifferenzierung
	GO:0045639 – positive Regulation der myeloischen Zelldifferenzierung
	GO:0045649 – Regulation der Makrophagendifferenzierung
	GO:0045651 – positive Regulation der Makrophagendifferenzierung
	GO:0050729 – Regulation der Entzündungsreaktion
	GO:0050857 – positive Regulation des Antigenrezeptor-vermittelten Signalweges
	GO:0050999 – Regulation der Stickstoffoxid-Synthase-Aktivität
	GO:0051092 – positive Regulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-kappaB
	GO:0061756 – Leukozytenadhäsion an vaskulären Endothelzellen
	GO:0071219 – zelluläre Reaktion auf Moleküle bakteriellen Ursprungs
	GO:0071887 – Prozess der Leukozyten-Apoptose
	GO:1902106 – negative Regulation der Leukozytendifferenzierung
	GO:1902107 – positive Regulation der Leukozytendifferenzierung
	GO:1903236 – Regulation der Bindung oder des Rollens von Leukozyten
	GO:1904994 – Regulation der Adhäsion von Leukozyten an vaskuläre Endothelzellen
	GO:1904996 – positive Regulation der Leukozytenadhäsion an vaskuläre Endothelzellen
miR-351-5p	GO:0002224 – Toll-like-Rezeptor-Signalweg
	GO:0030099 – Differenzierung der myeloischen Zellen
	GO:0034121 – Regulation des Toll-like-Rezeptor-Signalweges
	GO:0034122 – negative Regulation des Toll-like-Rezeptor-Signalweges

#### 4.3.4 Ermittlung der Zielgene der verändert exprimierten miRNAs

Um zu verstehen, ob und wie die stimulationsinduzierten Veränderungen im miRNA-Profil zur M1-Polarisierung der Makrophagen beitragen können, wurde mit Hilfe der Datenbank miRWalk 2.0 eine detaillierte Auflistung der putativen und experimentell validierten Zielgene der verändert exprimierten miRNAs erstellt (Tabelle 14). Diese wurden

auf immunologisch relevante Mediatoren von Makrophagenaktivierung und Makrophagenfunktion gescreent.

**Tabelle 14:** Anzahl der mittels miRWalk 2.0 ermittelten Zielgene

	<b>putative Zielgene</b>	<b>validierte Zielgene</b>
miR-7a-5p	1156	39
miR-148a-3p	902	40
miR-155-5p	654	87
miR-351-5p	1077	22
miR-1198-5p	742	13

Wie in Tabelle 15 aufgeführt, wurden IL1B, TNF und LYZ als Zielgene ermittelt. IL1B und TNF kodieren für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , welche charakteristische Botenstoffe M1-differenzierter Makrophagen repräsentieren. LYZ kodiert für das Protein Lysozym, welches im Rahmen der Abwehrfunktion von M1-Makrophagen am Abbau bakterieller Zellwände beteiligt ist. Weiterhin wurden zahlreiche Mediatoren der TLR-Signalübertragung als Zielgene identifiziert (Tabelle 15). Hierzu zählen CHUK und NFKBIB, deren Genprodukte eine wichtige Funktion bei der Regulation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B einnehmen. Ebenfalls mit NF $\kappa$ B assoziiert ist RELA, welches als putatives Zielgen von miR-148a-3p und miR-155-5p identifiziert wurde (Tabelle 15). RELA kodiert für die Untereinheit p65 des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B. Weiterhin mit der TLR-Signalkaskade in Verbindung stehen die Zielgene FOS und LY96. FOS kodiert für eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1. Lymphozyten Antigen-96 (LY96), welches auch MD-2 genannt wird, interagiert mit Toll-like-Rezeptoren im Rahmen der Ligandenbindung. Ferner wurden AKT1, CEBPB, CREB1, FOSL2 und SOCS1, welche als Teil des PI3K-Akt-Signalweges mit der Differenzierung zum M2-Phänotyp assoziiert sind, als Zielgene aufgedeckt (Tabelle 15). Ein weiterer Mediator der Makrohagendifferenzierung ist NFATC1, ein putatives Zielgen von miR-7a-5p (Tabelle 15). NFAT wird ein hemmender Einfluss auf die Makrophagendifferenzierung zugesprochen.

Zusammenfassend gehören zu den Zielgenen der nach gram-positiver Stimulation aufregulierten miRNAs Inhibitoren der NF $\kappa$ B-Aktivierung (z. B. CHUK und NFKBIB) sowie Mediatoren der M2-Differenzierung (z. B. AKT1, CEBPB, CREB1, SOCS1 und FOSL2). Hiermit im Einklang stehen die Befunde der NGS-Analyse des Transkriptom (siehe Kapitel 4.1.1), welche nach gram-positiver Stimulation der Makrophagen eine verminderte Expression von CREB1 (Faktor 0,6fach), FOSL2 (Faktor 0,5fach) und NFATC1 (Faktor

0,4fach) indizieren (Tabelle 8). Dies kann als Hinweis auf eine posttranskriptionelle Hemmung der Expression dieser Gene durch Hochregulation von miR-7a-5p, miR-148a-3p, miR-155-5p und miR-351-5p angesehen werden, wodurch in Ergänzung zur transkriptionellen Regulation nach TLR-Stimulation die Polarisierung zum M1-Phänotyp gefördert wird.

**Tabelle 15:** Ausgewählte Zielgene der verändert exprimierten miRNAs

	<b>Zielgene der TLR-Signalkaskade</b>	<b>M1-Makrophagen assoziierte Mediatoren</b>
miR-7a-5p	<u>putativ:</u> CREB1, FOS, NFATC1 <u>validiert:</u> -	<u>putativ:</u> - <u>validiert:</u> -
miR-148a-3p	<u>putativ:</u> CHUK, RELA <u>validiert:</u> -	<u>putativ:</u> IL1B <u>validiert:</u> -
miR-155-5p	<u>putativ :</u> FOSL2, RELA <u>validiert:</u> AKT1, CEBPB, FOS, SOCS1	<u>putativ:</u> - <u>validiert:</u> -
miR-351-5p	<u>putativ:</u> - <u>validiert:</u> NFKBIB	<u>putativ:</u> LYZ <u>validiert:</u> TNF
miR-1198-5p	<u>putativ:</u> - <u>validiert:</u> LY96	<u>putativ:</u> - <u>validiert:</u> -

AKT1 = AKT Serin/Threonin-Kinase 1, CEBPB = CCAAT-Enhancer-Bindungsprotein beta, CHUK = Bestandteil des Inhibitors des Nuklearfaktor-Kappa-B-Kinase-Komplexes, CREB1 = cAMP-responsive Element-Bindungsprotein 1, FOS = FOS Protoonkogen, FOSL = Fos-ähnlich, IL1B = Interleukin-1 Beta, LY96 = Lymphozyten Antigen-96, LYZ = Lysozym, NFATC1 = Kernfaktor der aktivierten T-Zellen 1, NFKBIB = NFκB-Inhibitor beta, RELA = RELA Protoonkogen/ NFκB-Untereinheit, SOCS1 = Suppressor der Zytokin-Signalübertragung 1, TNF = Tumornekrosefaktor-alpha

#### 4.4 Vergleich von gram-positiver mit gram-negativer Stimulation

Gram-positive wie auch gram-negative Stimulation induziert die Differenzierung der Makrophagen zum M1-Typ. Stellt man die Auswirkungen einer gram-positiven und einer gram-negativen Stimulation von Makrophagen auf das Transkriptom der Zellen gegenüber, findet sich ein hohes Maß an Kongruenz. Dies zeigt sich sowohl in übereinstimmenden Ergebnissen der GESA (siehe Kapitel 4.3.1) als auch in den der Tatsache, dass die NGS-Analyse in beiden Fällen eine veränderte Expression von Genen wie IL6, JUNB, LY96, MYD88 und TNF demonstrierte (Tabellen 8 und 16).

**Tabelle 16:** Übersicht verändert exprimierten Gene nach gram-negativer Stimulation

Gen	Abundanz Kontrolle (Mittelwert)	Abundanz LPS (Mittelwert)	mittlere Expressi- onsänderung	Cohen's d
AKT3	22,3	13,3	0,6	5,3
BCL2	9,1	3,3	0,4	5,4
BCL6	6,8	3,3	0,5	4,9
Creb1	9,4	6,7	0,7	7,4
FOS	14,6	3,8	0,3	2,3
FOSL1	0,9	5,2	5,6	-1,1
FOSL2	14,2	6,9	0,5	2,2
IL1B	0,4	24,5	55,7	-2,0
IL6	1,9	227,0	117,8	-2,5
JUNB	80,7	198,3	2,5	-3,4
LY96	5,3	10,0	1,9	-1,6
LYZ2	543,0	218,9	0,4	5,8
MAPK14	45,5	30,3	0,7	2,5
MYD88	17,1	27,6	1,6	-5,8
NFATC1	5,6	2,6	0,5	5,0
NFKB1	82,6	154,1	1,9	-3,0
NFKB2	67,4	105,7	1,6	-1,7
NFKBIA	64,3	197,2	3,1	-17,9
NFKBIB	20,8	61,2	2,9	-2,8
RIPK2	8,8	21,0	2,4	-8,4
TICAM1	5,3	9,5	1,8	-21,8
TLR4	14,6	10,6	0,7	2,2
TNF	53,0	277,7	5,2	-15,7

AKT3 = AKT Serin/Threonin-Kinase 3, BCL = B-Zell Lymphom, CREB1 = cAMP-responsive Element-Bindungsprotein 1, FOS = FOS Protoonkogen, FOSL = Fos-ähnlich, IL = Interleukin, JUN = Jun Protoonkogen, LYZ = Lysozym, LY96 = Lymphozyten Antigen-96, MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase, MYD88 = Myeloides Differenzierungsprotein 88, NFATC = Kernfaktor der aktivierten T-Zellen, NFKB1 = NFκB-Untereinheit 1, NFKB2 = NFκB-Untereinheit 2, NFKBIA = NFκB-Inhibitor alpha, NFKBIB = NFκB-Inhibitor beta, RIPK2 = Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Kinase 2, TICAM1 = TIR-Domäne enthaltendes Adapter-Molekül 1, TLR = Toll-artiger Rezeptor, TNF = Tumornekrosefaktor-alpha

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass eine gram-negative Stimulation der Makrophagen mittels LPS oder Ko-Kultur mit *P. aeruginosa* mit einer signifikanten Änderung der Expression der miRNAs miR-9-5p, miR-27b-3p, miR-93-5p, und miR-106b-5p einhergeht, wobei durchweg eine Herunterregulation der miRNAs zu beobachten ist

(Riechert et al. 2022). Um ein vollständiges Bild zu gewinnen, wurde die Expression dieser miRNAs auch in Proben gram-positiv stimulierter Makrophagen geprüft. Hierbei wurde für keine der genannten miRNAs eine signifikante Änderung der Expression im gram-positiven Milieu nachgewiesen. Auch die Testung, ob die nach gram-positiver Stimulation validierten miRNAs ebenso bei gram-negativer Stimulation Änderungen der Expression zeigen, verlief negativ. Es lässt sich demnach feststellen, dass die nach Stimulation erfolgenden Änderungen des miRNA-Expressionsprofils sich je nach Art des Stimulus (gram-positiv versus gram-negativ) unterscheiden, wobei sowohl die miRNAs selbst als auch die Richtung der Expressionsänderung variieren (Tabelle 17). Die Feinregulation der M1-Differenzierung auf posttranskriptioneller Ebene wird offenbar durch verschiedene miRNAs vermittelt.

**Tabelle 17:** Gegenüberstellung verändert exprimierter miRNAs nach Stimulation

	<b>gram-positive Stimulation</b>	<b>gram-negative Stimulation</b>
aufregulierte miRNAs	miR-7a-5p, miR148a-3p, miR-155-5p, miR-351-5p	-
herunterregulierte miRNAs	miR-1198-5p	miR-9-5p, miR-27b-3p, miR-93-5p, miR-106b-5p

Die Ermittlung TLR-assoziiierter Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf die Expression der nach gram-negativer Stimulation verändert exprimierten miRNAs ergab für miR-9-5p 13 Transkriptionsfaktoren, für miR-27b-3p 9 Transkriptionsfaktoren sowie für miR-93-5p und miR-106b-5p jeweils 2 Transkriptionsfaktoren (Tabelle 18). Die Liste der identifizierten Transkriptionsfaktoren war hierbei identisch zu den in Tabelle 12 aufgelisteten Befunden bei gram-positiver Stimulation. Dies ist ein Beleg dafür, dass die Änderung des miRNA-Expressionsprofils sowohl nach gram-positiver wie auch nach gram-negativer Stimulation durch AP-1 vermittelt wird.

**Tabelle 18:** TLR assoziierte Transkriptionsfaktoren im gram-negativen Milieu

<b>Transkriptionsfaktor</b>	<b>miR-9-5p</b>	<b>miR-27b-3p</b>	<b>miR-93-5p</b>	<b>miR-106b-5p</b>
ATF4	X	X	-	-
BCL6	X	X	-	-
BCL6B	X	X	-	-
ELK1	X	-	-	-
FOS	X	X	X	X

**Tabelle 18:** TLR assoziierte Transkriptionsfaktoren im gram-negativen Milieu (Fortsetzung)

Transkriptionsfaktor	miR-9-5p	miR-27b-3p	miR-93-5p	miR-106b-5p
FOSL2	X	X	-	-
JUN	X	X	-	-
JUNB	X	-	-	-
JUND	X	X	-	-
MAX	X	X	X	X
MYC	X	X	-	-
NFATC1	X	-	-	-
NFATC3	X	-	-	-

„X“ = Transkriptionsfaktor bindet an Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle der miRNA  
 „-“ = Transkriptionsfaktor bindet nicht an Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle der miRNA  
 ATF4 = aktivierender Transkriptionsfaktor 4, BCL = B-Zell Lymphom, ELK1 = ETS-ähnliches Protein-1, Fos = FOS Protoonkogen, FOSL = Fos-ähnlich, JUN = Jun Protoonkogen, MAX = Myc-assoziiertes Faktor X, MYC = Myc Protoonkogen, NFATC = Kernfaktor der aktivierten T-Zellen

Die ClueGO-basierte Clusteranalyse der Zielgene der nach gram-negativer Stimulation verändert exprimierten miRNAs deutete auf eine Beeinflussung der TLR-induzierten Signaltransduktion hin. In Übereinstimmung zur Situation nach gram-positiver Stimulation war eine signifikante Anreicherung der GO-Begriffe GO:0048583 (Regulation der Reaktion auf Stimuli), GO:0023051 (Regulation der Signalisierung), GO:0009966 (Regulation der Signaltransduktion), GO:0010468 (Regulation der Genexpression) und GO:0045595 (Regulation der Zelldifferenzierung) zu beobachten. In der Tat ergab die miRWalk-basierte Ermittlung von Zielgenen der miRNAs miR-9-5p, miR-27b-3p, miR-93-5p und miR-106b-5p zahlreiche Mediatoren der TLR4-Signalkaskade. Zu nennen sind IRAK 4, MAP3K7, MAP3K14, NFKB1, RELA, TAB1, TAB2, TAB3, TLR4 und TRAF6 (Tabelle 19). In Anbetracht der Beobachtung, dass es nach gram-negativer Stimulation zu einer Herunterregulation der miRNAs kommt, ist von einer verminderten Hemmung der Expression der in Tabelle 19 benannten Mediatoren des TLR4-Signalweges auszugehen. Es ergibt sich das Bild einer negativen Rückkopplung. Demnach erfolgt die Förderung der M1-Differenzierung nach gram-negativer TLR-Stimulation posttranskriptionell durch Schwächung der miRNA-vermittelten Inhibition der TLR4-Signalkaskade.



**Tabelle 19:** Zielgene der im gram-negativen Milieu verändert exprimierten miRNAs

<b>beeinflussende miRNA</b>	<b>Zielgen</b>
miR-9-5p	NFKB1, RELA, TAB2, TAB3
miR-27b-3p	MAP3K14, TAB2, TAB3, TRAF6
miR-93-5p	IRAK4, MAP3K7, MAP3K14, TAB1, TAB3, TLR4
miR-106b-5p	MAP3K14, TAB2, TRAF6

IRAK = Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase, MAP3K7 = Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 7, MAP3K14 = Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 14, NFKB1 = NFκB Untereinheit 1, RELA = RELA Protoonkogen, TAB = TGF-beta aktivierte Kinase 1 (MAP3K7) bindendes Protein, TLR4 = Toll-artiger Rezeptor 4, TRAF6 = TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6

Zusammenfassend zeigt der Vergleich von gram-positiver mit gram-negativer Stimulation, dass in beiden Situationen die TLR-induzierte Makrophagenaktivierung mit Veränderungen im miRNA-Profil einhergeht, wodurch sich eine Feinregulation der M1-Differenzierung auf posttranskriptioneller Ebene ergibt. Allerdings wird diese Feinabstimmung durch unterschiedliche miRNAs und divergierende posttranskriptionell ablaufende Prozessen erreicht.

## 5. Diskussion

Makrophagen wird im angeborenen Immunsystem eine tragende Rolle in der Abwehr von Pathogen zugesprochen. Maßgeblich hierfür ist die Plastizität der Immunzellen, d.h. die Fähigkeit in verschiedene Phänotypen zu differenzieren (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Eine Dysregulation der Differenzierung zum proinflammatorischen M1-Typ bzw. zum antiinflammatorischen M2-Typ wird mit akuten wie auch chronischen Krankheitszuständen in Zusammenhang gebracht (Sica und Mantovani 2012; Zhou et al. 2014; Orecchioni et al. 2019). Der Kontrolle der Makrophagendifferenzierung kommt daher grundsätzliche Bedeutung zu.

Makrophagen exprimieren auf der Zelloberfläche Rezeptoren der TLR-Familie. Aus der Literatur ist bekannt, dass durch Interaktion dieser Rezeptoren mit bakteriellen Zellwandbestandteilen (gram-positive Bakterien: LTA, gram-negative Bakterien: LPS) der RAC1-PI3K-Akt-Signalweg und der MYD88-abhängige Signalweg induziert werden, wodurch über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B Einfluss auf die Transkription spezifischer Gene genommen wird (Ogata et al. 1999; Takeda und Akira 2004; Takeda und Akira 2015). Es resultiert die Differenzierung zum M1-Phänotyp (Ogata et al. 1999; Takeda und Akira 2004; Takeda und Akira 2015), welcher durch oxidativen Burst und vermehrte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , gekennzeichnet ist (Walloschke et al. 2010; Schoeniger et al. 2011; Adolph et al. 2012). Die Mechanismen dieser transkriptionellen Regulation der Makrophagendifferenzierung sind in der Literatur ausführlich dokumentiert.

Transkriptionsfaktoren nehmen nicht nur Einfluss auf die Expression proteinkodierender Gene, sondern auch auf die Expression regulatorischer RNA-Moleküle, zu denen die miRNAs gehören (Cai et al. 2009; Essandoh et al. 2016). miRNAs wirken sich posttranskriptionell auf die mRNA-Stabilität sowie die Effizienz der Transkription aus (Filipowicz et al. 2008). Diese als posttranskriptionelle Regulation bezeichnete Kontrolle der Makrophagendifferenzierung rückt zunehmend in den Fokus der Forschung. Im Gegensatz zu den gut untersuchten und dokumentierten Mechanismen auf transkriptioneller Ebene sind jedoch die Erkenntnisse zur posttranskriptionellen Regulation der Makrophagendifferenzierung nur lückenhaft. So ist in der Literatur bisher keine vergleichende Untersuchung der durch gram-positive oder gram-negative Stimulation induzierten Veränderungen des miRNA-Profiles von Makrophagen dokumentiert. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen Hinweise auf eine Veränderung des miRNA-Profiles von Makrophagen

nach gram-negativer Stimulation. Aufgrund dieser Vorarbeiten wurde die Hypothese aufgestellt, dass es nach gram-positiver Stimulation ebenfalls zu Veränderungen im miRNA-Profil von Makrophagen kommt und dass diese Änderungen posttranskriptionell zur Differenzierung zum M1-Phänotyp beitragen. Ziele dieser Arbeit waren daher die Identifizierung der nach gram-positiver Stimulation verändert exprimierten miRNAs, das Erstellen eines Modells der posttranskriptionellen Regulationsmechanismen der M1-Differenzierung sowie die Gegenüberstellung der identifizierten miRNAs und ihrer Zielgene mit den Vorbefunden nach gram-negativer Stimulation.

In der vorliegenden Studie kam ein bewährtes, in der Arbeitsgruppe etabliertes Zellkulturmodell sowie ein standardisiertes Protokoll zum Einsatz, welches bereits erfolgreich zur Untersuchung von Fragestellungen zu Inflammation und Makrophagenfunktion im Zusammenhang mit TLR-Stimulation genutzt wurde (Schoeniger et al. 2016; Hellwing et al. 2018). Die M1-Differenzierung der Zellen nach gram-positiver bzw. gram-negativer Stimulation wurde mittels Sequenzierung des Transkriptoms geprüft. Die auf Basis der NGS-Daten durchgeführte GSEA belegte sowohl für LTA- als auch LPS-stimulierte Makrophagen eine signifikante Anreicherung von Gen-Datensätzen mit Assoziation zur M1-Differenzierung. In Folge einer gram-positiven Stimulation mit LTA wurde eine Aufregulation von zentralen Mediatoren der TLR-Signalkaskade, wie TLR2, LY96 und MDY88, sowie eine veränderte Expression von Untereinheiten der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB, wie JUNB, FOSL2 und NFκB2, beobachtet. Dies kann als verstärkte Aktivierung des TLR-Signalweges nach LTA-Stimulation gewertet werden. Des Weiteren war eine vermehrte Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und TNF-α, sowie eine Aufregulation proapoptotisch wirksamer Gene, wie BAD, BAK1 und BAX, festzustellen, was mit Literaturvorbefunden von Shapouri-Moghaddam et al. (2018) und Behar et al. (2011) übereinstimmt. In Analogie zu diesen Befunden wurden auch nach gram-negativer Stimulation mittels LPS Expressionsänderungen von Genen, welche für Mediatoren der TLR-Signalkaskade und proinflammatorische Zytokine kodieren, registriert (u.a. LY96, MYD88, JUNB, IL6, TNF). Diese Befunde sind ein Beleg für die Veränderungen auf mRNA-Ebene nach gram-positiver bzw. gram-negativer Stimulation, welche letztlich die Differenzierung zum M1-Phänotyp begünstigen.

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen einer Makrophagenstimulation auf das miRNA-Profil der Immunzellen analysiert. Aufgrund ihrer kleinen Größe sowie den spezifischen Eigenschaften ist der quantitative Nachweis von miRNAs technisch aufwendig umzusetzen, weshalb der Auswahl des geeigneten Verfahrens für die jeweilige Fragestellung sowie das gewählte Normalisierungsverfahren entscheidend für ein akkurates Ergebnis ist (Mestdagh et al. 2014). Mittels NGS können alle in einer Probe vorhandenen

miRNAs identifiziert werden. Durch die Option, auch neue und unbekannte miRNAs zu entdecken (Siddika und Heinemann 2020), hebt sich das NGS-Verfahren deutlich von anderen Methoden wie Microarray-Verfahren oder PCR-basierten Verfahren ab (Willenbrock et al. 2009; Liu et al. 2011; Pritchard et al. 2012). Nach aktuellem Stand der Forschung bietet eine NGS-Analyse daher eine gute Grundlage zur Identifizierung aller nach Stimulation von Makrophagen verändert exprimierten miRNAs.

Um die Ergebnisse der NGS-Analyse zu bestätigen, wurde eine Validierung mittels ddPCR angestrebt. Zur Auswahl der Validierungskandidaten wurden mehrere Kriterien herangezogen: die mittlere Expressionsänderung, der Cohen's d sowie die Abundanz. Die mittlere Expressionsänderung wird häufig als Hilfsmittel zur Identifizierung verändert exprimierter miRNAs genutzt. Als Grenzwerte werden dabei, wie auch in der vorliegenden Arbeit, Expressionsänderungen  $>2$ fach oder  $<0,5$ fach angesetzt (Graff et al. 2012; Cobos Jiménez et al. 2014; Li et al. 2018). Ferner findet häufig der Cohen's d Berücksichtigung. Der Cohen's d ist ein Maß für die Effektstärke und beschreibt, wie stark sich die Mittelwerte zweier Testgruppen voneinander unterscheiden. Dabei ist laut Cohen (1988) ein Wert  $\geq 0,8$  bzw.  $\leq -0,8$  mit einem großen Effekt vergesellschaftet. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit der Literatur die Abundanz als Kriterium genutzt, da bei Expressionsänderungen abundanter miRNAs im Vergleich zu geringgradig exprimierten miRNAs von einer höheren physiologischen Bedeutung auszugehen ist. Allgemeingültige Grenzwerte für die miRNA-Abundanz lassen sich in der Literatur nicht finden. Aufgrund der Vielzahl an potentiellen Validierungskandidaten wurde in der vorliegenden Arbeit die Grenze für Abundanz auf  $\geq 500$  Reads festgelegt. Vergleichbare Studien setzen den Grenzwert deutlich niedriger an (Cobos Jiménez et al. 2014; Lewandowska-Sabat et al. 2018). Lewandowska-Sabat et al. (2018) legten den Grenzwert bei einer Abundanz  $\geq 5$  Reads fest, während Cobos Jiménez et al. (2014) eine Abundanz  $> 10$  Reads in mindestens einer Testgruppe als Grenze verwendeten. Der in dieser Arbeit angelegte Grenzwert ist daher als sehr streng anzusehen.

Mit der Real-Time PCR steht laut der microRNA quality control (miRQC)-Studie eine geeignete Methode zur Quantifizierung von Expressionsunterschieden von miRNAs zur Verfügung (Mestdagh et al. 2014). Allerdings kann mit der klassischen Variante lediglich eine relative Bestimmung erfolgen unter Bezugnahme auf ein Referenzgen, dessen Expression unbeeinflusst durch die Bedingungen des Experimentes sein muss (Wong und Medrano 2005). Für miRNAs sind keine universellen Referenzgene bekannt. Vielmehr zeigen die in der Literatur mehrheitlich beschriebenen Referenzgene unter inflammatorischen Bedingungen Änderungen im Expressionsprofil (Reid et al. 2011). Infolgedessen werden unterschiedliche Referenzgenkandidaten im entzündlichen Setting diskutiert. So empfehlen Schlosser et al. (2015) eine Kombination der beiden miRNAs miR-142-3p

und miR-320a. Einschränkend ist festzuhalten, dass die Testung dieser miRNAs nur in zwei verschiedenen Krankheitszuständen erfolgte und die Empfehlung für die Verwendung in unfraktioniertem Vollblut limitiert ist (Schlosser et al. 2015). Hirschberger et al. (2019) untersuchten Referenzgene für T-Zellen und Vollblut im Rahmen von Sepsis und empfahlen eine Kombination aus miRNAs und kleinen nukleolaren RNA-Molekülen, doch steht hier eine Testung für andere Zelllinien und in abweichenden inflammatorischen Verhältnissen aus (Hirschberger et al. 2019). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe belegen die Nutzbarkeit von miR-27b-3p und miR-103a-3p im Kontext einer LPS-Stimulation der Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7, doch ist die Bestätigung dieser miRNAs als geeignete Referenzgene im gram-positiven Milieu noch anhängig (Link et al. 2019). Alternative Methoden zur Normalisierung beinhalten als Referenz kleine, nukleäre und nukleolare RNA-Moleküle, exogene Kontrollen in Form von Spike-in-Oligonukleotiden oder die Verwendung eines errechneten mittleren Expressionswerts aller miRNAs (Mestdagh et al. 2009; Link et al. 2019). Auch für diese Methoden gilt, dass sie sich nicht universell einsetzen lassen und durch ihre jeweiligen Limitationen die Ergebnissenauigkeit der quantitativen Real-Time PCR negativ beeinflussen können. Ein alternativer Ansatz ist die Verwendung der ddPCR. Dabei erfolgt die Verteilung der Probe auf ca. 20.000 Wasser-in-Öl-Tropfen definierter Größe, in denen die PCR-Reaktion durchgeführt wird. Unter Annahme einer Poisson-Verteilung wird anschließend die Anzahl der miRNA-Kopien/ $\mu$ l Probe bestimmt (Pinheiro et al. 2012; Kiseleva et al. 2016). Hervorzuheben ist die absolute Quantifizierung ohne Kalibratorsubstanz oder Referenzgen mit im Vergleich zur Real-Time PCR erhöhter Präzision und Reproduzierbarkeit bei ähnlicher bzw. erhöhter Sensitivität (Campomenosi et al. 2016; Wang et al. 2019). Auch wird der ddPCR eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen PCR-Inhibitoren zugesprochen (Hindson et al. 2013; Huggett et al. 2013). Voraussetzung für eine maximale Messgenauigkeit ist die optimale Verdünnung der cDNA, welche vorab mittels Verdünnungsreihen für jede zu untersuchende miRNA ermittelt werden muss. In Übereinstimmung mit Empfehlungen des Herstellers des genutzten ddPCR-Systems zeigen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, dass bei Messwerten von ca. 100 positiven Signalen eine höchstmögliche Validität der Messergebnisse gewährleistet ist (Kuhlmann et al. 2021). Weitere in der vorliegenden Arbeit angewandte Maßnahmen zur Sicherung von Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der ddPCR umfassten die Nutzung von validierten miRNA PCR Primer Sets des miRCURY LNA miRNA PCR Assays der Firma Qiagen nach Vorgaben des Herstellers sowie die Mitführung von Positiv- und Negativkontrollen. Es ist somit von einer hohen Qualität und Verlässlichkeit der ddPCR-Daten auszugehen. Mit Hilfe der ddPCR wurde die veränderte Expression von 5 miRNAs nach gram-positiver Stimulation experimentell validiert. Für die miRNAs miR-7a-5p, miR148a-3p, miR-155-

5p und miR-351-5p wurde eine Aufregulation und für die miRNA miR-1198-5p eine Herunterregulation nachgewiesen. Bisher existieren nur wenige Vorarbeiten, die sich mit dem miRNA-Expressionsprofil nach gram-positiver Stimulation befassen. Übereinstimmungen mit Vorbefunden aus der Literatur finden sich für miR-155-5p. So ist eine Aufregulation von miR-155-5p nach Kontakt mit den gram-positiven Bakterien *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis* und *Streptococcus pneumoniae* beschrieben (Schnitger et al. 2011; Ghorpade et al. 2012; Verschoor et al. 2014). Die in dieser Arbeit gezeigte Expressionssteigerung von miR-155-5p nach Stimulation mit LTA oder *Rhodococcus equi* legt daher in Zusammenschau mit den beschriebenen Vorbefunden nahe, dass gram-positive Stimuli unabhängig von der Bakterienart in Makrophagen die vermehrte Synthese von miR-155-5p induzieren. Hervorzuheben ist, dass in der Literatur ein Zusammenhang zwischen der Expression von miR-155-5p und der Pathogenabwehr durch Makrophagen dokumentiert ist. Belegt ist eine reduzierte Eliminierung von *Streptococcus pneumoniae* und *Mycobacterium bovis* nach Knockout von miR-155-5p in Makrophagen (Ghorpade et al. 2012; Verschoor et al. 2014).

Für die in dieser Arbeit validierte miRNA miR-1198-5p liegen in der Literatur bisher keine Vorarbeiten im inflammatorischen Setting vor. Hingegen finden sich in der Literatur für die miRNAs miR-7a-5p, miR-148a-3p und miR-351-5p Hinweise auf eine veränderte Expression nach gram-negativer Stimulation. Einschränkend ist festzuhalten, dass diese Befunde auf Basis der quantitativen Real-Time PCR unter Verwendung von kontrovers diskutierten Normalisierungsmethoden ermittelt und zudem die Befunde mehrheitlich nicht an isolierten Makrophagen erhoben wurden. In einer aktuellen Studie wurde eine signifikante Aufregulation von miR-7a-5p im Serum LPS-stimulierter Ratten aufgezeigt (Azizoğlu et al. 2020). Die veränderte Expression wurde dabei mit einer quantitativen Real-Time PCR unter Verwendung einer Normalisierung auf Basis der Berechnung eines mittleren Expressionswertes aller miRNAs ermittelt. Die Aussagekraft dieser Studie ist aufgrund dieser Normalisierungsmethode kritisch zu beleuchten, da von vielen Autoren die Anwendung der Methode nur für große Datenmengen und der parallelen Untersuchung vieler miRNAs empfohlen wird (D'haene et al. 2012; Tania Nolan et al. 2013). Da in dieser Studie nur 9 miRNAs untersucht wurden, ist von einer eingeschränkten Anwendbarkeit dieser Normalisierungsmethode auszugehen. Außerdem wurden in dieser Studie Makrophagen nicht isoliert betrachtet. Es ist daher unklar, auf welche Zellen die gesteigerten Level von miR-7a-5p im Serum zurückzuführen sind. Von Zhao et al. (2016) wurde eine signifikante Aufregulation von miR-7 in murinen Lungengewebe nach LPS-Stimulation dokumentiert. Diese Daten wurden mit quantitativer Real-Time PCR unter Normalisierung mittels des kleinen, nukleären RNA-Molekül U6 erhoben. Allerdings liegen in der Literatur Hinweise vor, dass die Expression von U6 im inflammatorischen

Milieu nicht stabil ist (Benz et al. 2013). Deshalb ist die Eignung dieses nukleären RNA-Moleküls als Referenz zur Normalisierung von miRNA-Daten in diesem Milieu zu hinterfragen. Kritisch zu betrachten ist zudem, dass keine Unterscheidung der miRNA-Expression nach den im murinen Lungengewebe vorhandenen Zellen erfolgte. Somit kann anhand der vorliegenden Daten nicht abgeschätzt werden, ob die festgestellte Expressionsveränderung von miR-7 auf Makrophagen zurückzuführen ist. Interessanterweise war in dieser Studie ein Knockout von mir-7 mit einer verminderten Anzahl von Immunzellen, inklusive Makrophagen, sowie einer reduzierten Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  in der bronchoalveolären Lavage LPS-stimulierter Mäuse assoziiert (Zhao et al. 2016). Dies kann als Hinweis einer immunologischen Relevanz von miR-7 für die Makrophagenfunktion gewertet werden. Huang et al. (2017) verwendeten ebenfalls eine quantitative Real Time PCR mit U6 als Referenzgen um eine signifikante Aufregulation von miR-148a-3p in murinem aus dem Knochenmark stammende Makrophagen nachzuweisen. Die gram-negative Stimulation erfolgte dabei durch LPS und IFN- $\gamma$ . Auch bei dieser Studie ist der Hauptkritikpunkt die Verwendung von U6 zur Normalisierung. Die generierten Daten liefern jedoch Hinweise auf eine immunologische Relevanz von miR-148a-3p im gram-negativen Setting. Einhergehend mit einer Aufregulation von miR-148a-3p konnten Huang et al. (2017) eine vermehrte Expression M1-Makrophagen assoziierter Mediatoren, wie iNOS, IL-6 und TNF- $\alpha$ , eine erhöhte bakterizide Wirkung und eine gesteigerte ROS-Produktion feststellen. Da gleichzeitig eine Reduktion eines Markers der M2-Differenzierung erkennbar war, schlussfolgerten Huang et al. (2017) dass miR-148a-3p die Differenzierung zum M1-Phänotyp fördert. Ebenfalls in Vorarbeiten im Zusammenhang mit Inflammation untersucht wurde miR-351-5p. Dabei zeigte sich eine signifikante Aufregulation von miR-351-5p im Lungengewebe intratracheal mit LPS stimulierter Mäuse (Hu et al. 2021). Zur Detektion der veränderten Expression wurde in dieser Studie eine quantitative Real-Time PCR unter Verwendung einer Normalisierung mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) genutzt. Eine Normalisierung mittels GAPDH im inflammatorischen Setting wird ähnlich kontrovers diskutiert, wie eine Normalisierung mittels U6. Grund hierfür sind Studien, die nachweisen, dass die Expression von GAPDH im inflammatorischen Setting verändert ist, wodurch GAPDH sich nicht für die Normalisierung im inflammatorischen Milieu eignet (Cummings et al. 2014; Tanaka et al. 2017). Wie auch bei der Studie von Zhao et al. (2016) ist in dieser Studie keine Unterscheidung der miRNA-Expression nach den im murinen Lungengewebe nachweisbaren Zellen erfolgt, so dass unklar ist, durch welche Zellen die Expressionsänderung vermittelt wird. Somit ist die Übertragbarkeit der Daten auf das Expressionsniveau von miR-351-5p in Makrophagen kritisch zu hinterfragen. Nichtsdestotrotz zeigt die Studie, dass der LPS-Effekt auf das Lungengewebe durch

Gabe eines miR-351-5p-Agomirs verstärkt wird (Hu et al. 2021). Somit liegt auch für miR-351-5p ein experimenteller Beleg für die Involvierung dieser miRNA in inflammatorischen Prozessen vor.

Die vorliegende Arbeit liefert erstmalig Belege für eine Expressionsänderung der miRNAs mir-7a-5p, miR-148a-3p, miR-351-5p und miR-1198-5p durch Makrophagen nach gram-positiver Stimulation. Die ddPCR-Befunde bestätigen die Hypothese, dass eine gram-positive Stimulation von Makrophagen Auswirkungen auf das miRNA-Profil der Immunzellen hat. Eine Expressionssteigerung der miRNAs mir-7a-5p, miR-148a-3p und miR-351-5p im gram-negativen Setting bestätigte sich entgegen Hinweisen aus der Literatur hingegen nicht. Aufgelöst wird dieser scheinbare Widerspruch durch methodische Limitationen jener Vorarbeiten sowie durch Unterschiede im untersuchten Probenmaterial. Hervorzuheben ist, dass publizierte experimentelle Befunde auf eine immunologische Relevanz der validierten miRNAs hinweisen. Der Nachweis der veränderten Expression dieser miRNAs legt daher eine detaillierte Untersuchung potentieller Mechanismen und Effekte dieser miRNAs auf die Makrophagendifferenzierung nahe.

Die Mechanismen, die der veränderten miRNA-Expression nach gram-positiver Stimulation zu Grunde liegen, wurden im Rahmen einer *in silico*-Analyse näher beleuchtet. Im Ergebnis wurde ein Zusammenhang zwischen der TLR2-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 und der Aufregulation von miR-7a-5p, miR-148a-3p und miR-155-5p aufgezeigt. Bereits im Jahr 2007 wurde von O'Connell et al. (2007) spekuliert, dass die veränderte Expression von miR-155-5p nach TLR2-Stimulation durch AP-1 vermittelt wird, da im Promotor des miRNA-Gens Bindungsstellen für diesen Transkriptionsfaktor zu finden sind. Diese Befunde wurden durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Darüber hinaus gelang erstmalig der Nachweis der Beeinflussung der Expression von miR-7a-5p und miR-148a-3p durch TLR2, welcher bisher in der Literatur nicht beschrieben ist. Die Daten der *in silico*-Analyse belegen, dass die Gene der miRNAs miR-7a-5p, miR-148a-3p und miR-155-5p Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie aufweisen. Zu den identifizierten Interaktionspartnern gehörten Untereinheiten von AP-1, wie FOS, FOSL2, JUN, JUNB und JUND (Ogata et al. 1999; Vesely et al. 2009), mit AP-1 kooperierende Transkriptionsfaktoren, wie ATF4, NFATC1 und NFATC3 (Rao et al. 1997; Macián et al. 2001; Zhang et al. 2013a) sowie die Transkriptionsfaktoren BCL6 und BCL6B, welche eine Repression der AP-1 Aktivität vermitteln (Hatzi et al. 2015) und die Transkriptionsfaktoren MAX und MYC, deren Expression unter dem Einfluss von AP-1 steht (Vartanian et al. 2011; Ding et al. 2020). In Ergänzung zu den *in silico*-Befunden zeigten die NGS-Daten des Transkriptoms eine deutliche Expressionssteigerung von JUNB und ATF4 nach gram-positiver Stimulation, während der



AP-1-Inhibitor BCL6 herunterreguliert war. Aus diesen Resultaten lässt sich schlussfolgern, dass die durch TLR2-Stimulation induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie unmittelbar die Aufregulation von miR-7a-5p, miR-148a-3p und miR-155-5p vermittelt. Die Expressionsänderung der miRNAs miR-351-5p und miR-1198-5p scheint hingegen auf einem anderen Weg herbeigeführt zu werden. Einen möglichen Erklärungsansatz liefert eine Studie aus dem Jahr 2014, in welcher der Einfluss von miR-155-5p auf die Expression anderer miRNAs untersucht und eine Hierarchie der miRNA-Expression postuliert wurde, in deren Mittelpunkt miR-155-5p steht (Dueck et al. 2014). In dieser Studie wurde in LPS-stimulierten, aus murinen Knochenmark stammenden, Makrophagen mittels NGS ein Einfluss von miR-155-5p auf die Expression weiterer miRNAs festgestellt und mittels Northern Blot bestätigt. Eine Prüfung der Rolle von miR-155-5p als Regulator der Expression von miRNAs im gram-positiven Setting steht bislang aus, sollte aber speziell mit Blick auf die miRNAs miR-351-5p und miR-1198-5p in Folgeuntersuchungen umgesetzt werden.

Die *in silico*-Analyse lieferte nicht nur Belege für die TLR-vermittelte Aufregulation der miRNAs. Durch die Untersuchungen konnte auch eine Beteiligung von miR-7a-5p, miR-148a-3p, miR-155-5p und miR-351-5p an der Regulation der Makrophagendifferenzierung nachgewiesen werden. Der Zusammenhang zwischen den verändert exprimierten miRNAs und der M1-Differenzierung sowie Prozessen der Immunabwehr wurde mittels ClueGO-Analyse ersichtlich. Die Clusteranalyse der mittels miRWalk identifizierten putativen und experimentell validierten Zielgene der verändert exprimierten miRNAs ergab eine signifikante Anreicherung von Prozessen, die mit M1-Differenzierung und Immunabwehr assoziiert sind. Dies ist als klarer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Aufregulation von miR-7a-5p, miR-148a-3p, miR-155-5p und miR-351-5p nach gram-positiver Stimulation und den ebenso feststellbaren Veränderungen der Makrophagen im Sinne einer M1-Differenzierung zu werten.

Die detaillierte Betrachtung der Zielgene der verändert exprimierten miRNAs offenbarte unter anderem den Einfluss auf Inhibitoren des RAC1-PI3K-Akt-Signalwegs und des MYD88-abhängigen Signalwegs. Zu den Zielgenen von miR-148a-3p und miR-351-5p zählen die Inhibitoren der NFκB-Aktivierung CHUK und NFKBIB (Ogata et al. 1999), weshalb eine Aufregulation dieser miRNAs mit einer verminderten Inhibition der NFκB-Aktivierung einhergehen dürfte. Ein identifiziertes Zielgen von miR-7a-5p und miR-155-5p ist FOS. Eine verminderte Expression von FOS ist laut einer Studie von Hop et al. (2018) mit einer vermehrten TLR-Expression verbunden. Eine Expressionshemmung von FOS durch Aufregulation von miR-7a-5p und miR-155-5p kann somit in einer Erhöhung der TLR-Rezeptordichte resultieren. Weiterhin wiesen die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Regulation der Makrophagendifferenzierung durch Hemmung der Expression

von Mediatoren der M2-Differenzierung hin. Zu diesen mit M2-Differenzierung assoziierten Zielgenen zählen AKT1, CEBPB, CREB1, FOSL2 und SOCS1 (Ruffell et al. 2009; Wen et al. 2010; Wilson 2014; Luan et al. 2015; McCormick und Heller 2015; Vergadi et al. 2017; Sarode et al. 2020). Auch eine generelle Entthemmung der Makrophagendifferenzierung wurde durch die *in silico*-Daten indiziert. So konnte das Gen NFAT, welches für einen bedeutenden Inhibitor der Makrophagendifferenzierung kodiert (Fric et al. 2012), als Zielgen der miRNA miR-7a-5p identifiziert werden. Eine posttranskriptionelle Hemmung der Expression von NFAT durch miR-7a-5p wirkt sich demzufolge förderlich auf Makrophagendifferenzierung aus.

Ausgehend von den Befunden der vorliegenden Arbeit kann nachfolgendes Modell der posttranskriptionellen Regulation der M1-Differenzierung nach gram-positiver Stimulation abgeleitet werden: TLR-Stimulation induziert über die Aktivierung des RAC1-PI3K-Akt-Signalwegs und des MYD88-abhängigen Signalwegs und der hieraus folgenden Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1 die Expressionssteigerung der miRNAs miR-7a-5p, miR148a-3p, miR-155-5p und miR-351-5p. Diese miRNAs wirken inhibierend auf die Expression von Mediatoren der M2-Differenzierung und hemmen zugleich die Expression von Schlüsselinhibitoren des RAC1-PI3K-Akt-Signalwegs und des MYD88-abhängigen Signalwegs. Es ergibt sich das Bild eines selbstverstärkenden Effektes des RAC1-PI3K-Akt-Signalwegs und des MYD88-abhängigen Signalwegs auf posttranskriptioneller Ebene, wodurch die Differenzierung von Makrophagen zum proinflammatorischen M1-Phänotyp begünstigt wird. Die vorliegende Studie bestätigt die Hypothese, dass miRNAs an der posttranskriptionellen Regulation der Makrophagendifferenzierung beteiligt sind. Ferner wurden Schlüssel-miRNAs identifiziert und eine schlüssige Erklärung des Wirkmechanismus abgeleitet. Die vorliegende Arbeit schafft somit eine Grundlage für das Verständnis der posttranskriptionellen Regulation der M1-Differenzierung. Die experimentelle Validierung des propagierten Wirkmechanismus sollte in Folgeuntersuchungen erfolgen.

Wie bereits ausgeführt, zeigen die Befunde der NGS-Analyse und der GSEA des Transkriptoms gram-positiv und gram-negativ stimulierter Makrophagen ein hohes Maß an Übereinstimmung. In beiden Fällen löst die TLR-Stimulation eine M1-Differenzierung aus, wobei auf transkriptioneller Ebene kongruente Anpassungen zu beobachten sind. Von daher war es von Interesse zu prüfen, ob sich diese Übereinstimmungen auch im miRNA-Profil gram-positiv bzw. gram-negativ stimulierter Makrophagen fortsetzen und inwiefern sich Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede in der Vermittlung der posttranskriptionellen Regulation der Makrophagendifferenzierung aufzeigen lassen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten ddPCR-Untersuchungen belegten, dass es nach gram-positiver wie auch gram-negativer Stimulation zu Veränderungen im miRNA-Profil der

Makrophagen kommt, wobei allerdings erhebliche Unterschiede in der Art und der Richtung der Expressionsänderung festzustellen waren. Während nach gram-positiver Stimulation eine Aufregulation von miR-7a-5p, miR148a-3p, miR-155-5p und miR-351-5p beobachtet wurde, trat nach gram-negativer Stimulation eine Herunterregulation von miR-9-5p, miR-27b-3p, miR-93-5p und miR-106b-5p zutage. In Übereinstimmung mit diesen Befunden finden sich in der Literatur Hinweise auf eine veränderte Expression dieser miRNAs in Makrophagen im gram-negativen Milieu. So beschreiben Arenas-Padilla und Mata-Haro (2018) eine Herunterregulation von miR-93-5p nach LPS Stimulation von RAW264.7 und für miR-106b-5p konnte in einer Studie von Shi et al. (2020) eine verminderte Expression nach LPS-Stimulation von murinen Peritonealmakrophagen gezeigt werden. Obgleich damit belegt ist, dass erhebliche Unterschiede im miRNA-Profil gram-positiv und gram-negativ simulierter Makrophagen bestehen, weisen die Befunde der in dieser Arbeit durchgeführten *in silico*-Analyse darauf hin, dass in beiden Fällen die Expressionsänderung der miRNAs durch den Transkriptionsfaktor AP-1 sowie mit AP-1 assoziierte Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Sowohl die Gene der nach gram-positiver als auch die Gene der nach gram-negativer Stimulation verändert exprimierten miRNAs verfügen über Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie. Des Weiteren zeigten die Befunde der *in silico*-Analyse, dass die nach gram-negativer Stimulation verändert exprimierten miRNAs, analog zur gram-positiven Situation, posttranskriptionell an der Regulation der M1-Differenzierung beteiligt sind. ClueGO-Analyse, Befunde der miRWalk-Datenbank sowie Daten aus der Literatur weisen übereinstimmend auf eine Beeinflussung von Schlüsselmediatoren des RAC1-PI3K-Akt-Signalwegs und des MYD88-abhängigen Signalwegs durch die miRNAs miR-9-5p, miR-27b-3p, miR-93-5p und miR-106b-5p hin (Nahid et al. 2011; O'Neill et al. 2011; Li und Shi 2013; Arenas-Padilla und Mata-Haro 2018). Aufgrund der beobachteten Herunterregulation der Expression der genannten miRNAs nach gram-negativer Stimulation ist von einer Herabsetzung der posttranskriptionellen Expressionsinhibition auszugehen, welche schlussendlich in einer Förderung der M1-Differenzierung mündet. Induktion des RAC1-PI3K-Akt-Signalwegs und des MYD88-abhängigen Signalwegs nach gram-negativer Stimulation bewirkt demzufolge, vermittelt durch Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie, die Herunterregulation der miRNAs miR-9-5p, miR-27b-3p, miR-93-5p und miR-106b-5p, wodurch die Expression von Schlüsselmediatoren des RAC1-PI3K-Akt-Signalwegs und des MYD88-abhängigen Signalwegs enthemmt und folglich gesteigert wird. Insgesamt zeigt der Vergleich von gram-positiver mit gram-negativer Stimulation, dass in beiden Situationen die TLR-induzierte Makrophagenaktivierung mit Veränderungen im miRNA-Profil einhergeht, woraus eine Feinregulation der M1-Differenzierung auf post-

transkriptioneller Ebene resultiert. Diese Feinabstimmung wird dabei durch unterschiedliche miRNAs und sich unterscheidende posttranskriptionell ablaufende Prozessen erreicht.

Die Differenzierung von Makrophagen unterliegt dem Einfluss von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe belegen, dass eine Supplementierung von Makrophagen mit PUFA, wie DHA oder AA, die M2-Differenzierung begünstigt, woraus eine Expressionsminderung proinflammatorischer Zytokine sowie eine gesteigerte Phagozytoserate resultiert (Schoeniger et al. 2011; Adolph et al. 2012; Kawano et al. 2019). Als Ursache für die antiinflammatorische Wirkung werden diverse Mechanismen diskutiert, so auch ein Einfluss auf die transkriptionelle Regulation der Makrophagendifferenzierung. Es ist bekannt, dass eine Supplementierung von Makrophagen mit PUFA zu einem Einbau in die Zellmembran führt und eine veränderte Membranzusammensetzung insbesondere der lipid rafts bewirkt (Schumann et al. 2011). Lipid rafts sind spezialisierte Membrandomänen, welche als Signalplattformen der Auslösung von Signalkaskaden dienen (Calder 2008; Serhan et al. 2008; Da Oh et al. 2010). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass der Einbau von PUFA in die lipid rafts die Membranalokalisation von Rezeptorproteinen verändert und einen negativen Effekt auf die in der Membran stattfindende Interaktion von TLR4 und CD14 nach gram-negativer Stimulation hat (Schoeniger et al. 2016). Hingegen war im gram-positiven Milieu kein Einfluss einer PUFA-Supplementierung auf die Heterodimerisierung von TLR2 mit TLR1 bzw. TLR6 nachweisbar (Hellwing et al. 2018). Offenbar wird die Wirkung der PUFA unter gram-positiven und gram-negativen Bedingungen über verschiedene Mechanismen vermittelt. In einem Rattenmodell wurden erste Effekte einer PUFA-Supplementierung auf das miRNA-Profil gezeigt (Zheng et al. 2015). Dies warf die Frage auf, ob die nach PUFA-Supplementierung veränderte Lipidzusammensetzung der Zellmembranen die Genexpression im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens nicht nur auf transkriptioneller sondern auch auf posttranskriptioneller Ebene beeinflussen könnte.

Die Hypothese, dass miRNAs an der PUFA-induzierten Beeinflussung der Makrophagendifferenzierung zum M2-Phänotyp beteiligt sind, wurde durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten ddPCR-Untersuchungen widerlegt. Supplementierung der Makrophagen mit der ungesättigten Fettsäure DHA resultierte bei keinem der mittels NGS-Screenings identifizierten miRNA-Kandidaten in einen signifikanten Effekt. Bei Supplementierung der Makrophagen mit AA zeigte sich für miR-7a-5p und miR-155-5p eine signifikante Steigerung des Stimulationseffektes bei Ko-Kultur mit *Rhodococcus equi* nicht aber des Stimulationseffektes von LTA. Die nach PUFA-Supplementierung verän-

derte Lipidzusammensetzung der Zellmembranen hat demnach nur einen geringen posttranskriptionellen Einfluss auf die Genexpression im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens im gram-positiven Milieu. Für die Untersuchung der Mechanismen der antiinflammatorische Wirkung von PUFA insbesondere nach gram-positiver Stimulation sollte der Fokus der Forschung daher auf andere potentiell relevantere Mechanismen gelegt werden.

## 6. Zusammenfassung

Im angeborenen Immunsystem nehmen Makrophagen eine zentrale Position in der Bekämpfung von Pathogenen sowie in der Aufrechterhaltung der Gesundheit des Organismus ein. Entscheidend für die Funktionalität der Immunzellen ist ihre Plastizität, d.h. die Fähigkeit zur Differenzierung in den proinflammatorischen M1- oder den anti-inflammatorischen M2-Typ. Die Makrophagendifferenzierung muss engmaschig kontrolliert und reguliert werden, da eine Dysregulation mit akuten und chronischen pathophysiologischen Prozessen assoziiert ist. Diese Kontrolle findet sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene statt. Insbesondere die Mechanismen auf transkriptioneller Ebene sind in der Literatur bereits ausführlich beschrieben. Die verfügbaren Kenntnisse zur Regulation der Makrophagendifferenzierung auf posttranskriptioneller Ebene lassen aber bisher viele Fragen offen.

Im Mittelpunkt der posttranskriptionellen Regulation stehen nicht-kodierende kleine RNA-Moleküle, die sogenannten miRNAs. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beschreiben eine Änderung im miRNA-Profil von Makrophagen nach gram-negativer Stimulation. Offen war hingegen, inwiefern auch nach gram-positiver Stimulation eine Modifikation im miRNA-Profil resultiert. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung der nach gram-positiver Stimulation von Makrophagen verändert exprimierten miRNAs sowie die Gegenüberstellung von gram-negativer und gram-positiver Situation. Vor dem Hintergrund von Berichten eines potentiellen Einflusses von mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurde zudem der PUFA-Effekt auf die miRNA-Expression von Makrophagen geprüft.

Ein Screening mittels NGS-Analyse und anschließende experimentelle ddPCR-basierte Validierung führten zur Identifizierung von 4 miRNAs (miR-7a-5p, miR-148a-3p, miR-155-5p und miR-351-5p), welche in Folge einer gram-positiven Stimulation der Makrophagen signifikant verstärkt exprimiert waren. Ein Einfluss einer Fettsäuren-Anreicherung der Makrophagen auf das miRNA-Profil der Immunzellen bestätigte sich hingegen nicht. Demzufolge widerlegen die vorliegenden Daten die Hypothese, dass die immunmodulierenden PUFA-Effekte posttranskriptionell vermittelt seien.

Die *in silico*-basierte Charakterisierung der identifizierten miRNAs ergab eine direkte Verbindung zwischen dem Stimulationsereignis und der beobachteten Aufregulation von miR-7a-5p, miR-148a-3p und miR-155-5p. Gram-positive Stimulation von Makrophagen induziert den RAC1-PI3K-Akt-Signalweg und den MYD88-abhängigen Signalweg, wodurch der Transkriptionsfaktor AP-1 sowie mit AP-1 assoziierte Transkriptionsfaktoren

aktiviert werden. Die Gene der benannten miRNAs wiederum verfügen über Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie, so dass diese unmittelbar Einfluss auf deren Expressionsrate nehmen können.

Interessanterweise sind die identifizierten miRNAs ihrerseits in der Lage, die Expression zentraler Mediatoren des RAC1-PI3K-Akt-Signalweges und des MYD88-abhängigen Signalweges zu beeinflussen. Zu den Zielgenen von miR-7a-5p, miR-148a-3p, miR-155-5p und miR-351-5p zählen Inhibitoren der NF $\kappa$ B-Aktivierung (z.B. CHUK und NFKBIB) und Mediatoren der M2-Differenzierung (z.B. AKT1, CEBPB, CREB1, SOCS1 und FOSL2). Die posttranskriptionelle Repression dieser Zielgene durch die nach gram-positiver Stimulation vermehrt exprimierten miRNAs wirkt demzufolge begünstigend auf die M1-Differenzierung aus. Hieraus lässt sich ein miRNA-vermittelter, selbstverstärkender Effekt des RAC1-PI3K-Akt-Signalweges und des MYD88-abhängigen Signalweges ableiten.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe belegen, dass eine gram-negative Aktivierung von Makrophagen mit der Herunterregulation der miRNAs miR-9-5p, miR-27b-3p, miR-93-5p, und miR-106b-5p einhergeht. Eine Testung der Expression der nach gram-positiver Stimulation validierten miRNAs in Proben gram-negativ stimulierter Makrophagen zeigte keine signifikanten Effekte. Gleiches galt für die Expressionsrate der nach gram-negativer Stimulation validierten miRNAs in Proben gram-positiv stimulierter Makrophagen. Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass eine Aktivierung von Makrophagen mit Änderungen im miRNA-Expressionsprofil einhergeht, wobei die betroffenen miRNAs selbst als auch die Richtung der Expressionsänderung in Abhängigkeit von der Art des Stimulus (gram-positiv versus gram-negativ) variiert.

Gram-negative Stimulation von Makrophagen induziert in Analogie zur gram-positiven Stimulation den RAC1-PI3K-Akt-Signalweg und den MYD88-abhängigen Signalweg und mündet in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie. Und in der Tat weisen die Gene der miRNAs miR-9-5p, miR-27b-3p, miR-93-5p, und miR-106b-5p Bindungsstellen für AP-1 und assoziierte Transkriptionsfaktoren auf. Somit kann die Änderung des miRNA-Expressionsprofils sowohl nach gram-positiver wie auch nach gram-negativer Stimulation als AP-1-vermittelt angesehen werden.

Die Prüfung der Zielgene der nach gram-negativer Stimulation herunterregulierten miRNAs zeigte, dass diese auf zentrale Mitglieder des RAC1-PI3K-Akt-Signalwegs und des MYD88-abhängigen Signalwegs (z.B. TLR4, IRAK4, MAP3K7, MAP3K14, TRAF6, NFKB1 und RELA) abzielen. Dies deutet auf eine negative Rückkopplung hin. Herunterregulation von miR-9-5p, miR-27b-3p, miR-93-5p und miR-106b-5p geht demzufolge mit

einer Abschwächung der posttranskriptionellen Hemmung von TLR4-induzierten Signalkaskaden einher.

In der Summe wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die TLR-induzierte Makrophagenaktivierung mit Veränderungen im miRNA-Profil einhergeht, woraus eine Feinregulation der M1-Differenzierung auf posttranskriptioneller Ebene resultiert. Die posttranskriptionell ablaufenden Prozesse unterscheiden sich hierbei im gram-positiven und gram-negativen Milieu und basieren auf verschiedenen miRNAs. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Januar 2022 im Journal „Genes“ veröffentlicht (Riechert et al. 2022).



## 7. Literaturverzeichnis

- (10.09.2022) miRBase. <https://mirbase.org/>. Zugegriffen: 10. September 2022
- Abdolmaleki F, Kovanen PT, Mardani R, Gheibi-hayat SM, Bo S, Sahebkar A (2020) Resolvins: Emerging Players in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Clinic Rev Allerg Immunol* 58:82–91. doi:10.1007/s12016-019-08754-9
- Adolph S, Fuhrmann H, Schumann J (2012) Unsaturated fatty acids promote the phagocytosis of *P. aeruginosa* and *R. equi* by RAW264.7 macrophages. *Curr Microbiol* 65:649–655. doi:10.1007/s00284-012-0207-3
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA (New York, N.Y.)* 9:277–279. doi:10.1261/rna.2183803
- Arenas-Padilla M, Mata-Haro V (2018) Regulation of TLR signaling pathways by microRNAs: implications in inflammatory diseases. *Central-European journal of immunology* 43:482–489. doi:10.5114/ceji.2018.81351
- Atri C, Guerfali FZ, Laouini D (2018) Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *International journal of molecular sciences* 19. doi:10.3390/ijms19061801
- Azizoğlu M, Ayaz L, Bayrak G, Yılmaz BC, Birbiçer H, Doruk N (2020) Evaluation of miRNAs Related with Nuclear Factor Kappa B Pathway in Lipopolysaccharide Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *International journal of molecular and cellular medicine* 9:130–139. doi:10.22088/IJMCM.BUMS.9.2.130
- Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, Tamassia N, Mantovani A, Cassatella MA, Locati M (2009) Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:5282–5287. doi:10.1073/pnas.0810909106
- Behar SM, Martin CJ, Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan H-X, Divangahi M, Remold HG (2011) Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol* 4:279–287. doi:10.1038/mi.2011.3

- Benz F, Roderburg C, Vargas Cardenas D, Vucur M, Gautheron J, Koch A, Zimmermann H, Janssen J, Nieuwenhuijsen L, Luedde M, Frey N, Tacke F, Trautwein C, Luedde T (2013) U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Exp Mol Med* 45:e42. doi:10.1038/emm.2013.81
- Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman W-H, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J (2009) ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25:1091–1093. doi:10.1093/bioinformatics/btp101
- Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J (2009) A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 7:147–154. doi:10.1016/S1672-0229(08)60044-3
- Calder PC (2001) Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids* 36:1007–1024. doi:10.1007/s11745-001-0812-7
- Calder PC (2008) The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 79:101–108. doi:10.1016/j.plefa.2008.09.016
- Campomenosi P, Gini E, Noonan DM, Poli A, D'Antona P, Rotolo N, Dominioni L, Imperatori A (2016) A comparison between quantitative PCR and droplet digital PCR technologies for circulating microRNA quantification in human lung cancer. *BMC biotechnology* 16:60. doi:10.1186/s12896-016-0292-7
- Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I (2015) Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Frontiers in Immunology* 6:263. doi:10.3389/fimmu.2015.00263
- Christie WW, Harwood JL (2020) Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators. *Essays in Biochemistry* 64:401–421. doi:10.1042/EBC20190082
- Cobos Jiménez V, Bradley EJ, Willemsen AM, van Kampen AHC, Baas F, Kootstra NA (2014) Next-generation sequencing of microRNAs uncovers expression signatures in polarized macrophages. *Physiological genomics* 46:91–103. doi:10.1152/physiolgenomics.00140.2013
- Cohen J (1988) *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Erlbaum, Hillsdale, NJ
- Cummings M, Sarveswaran J, Homer-Vanniasinkam S, Burke D, Orsi NM (2014) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is an inappropriate housekeeping gene

for normalising gene expression in sepsis. *Inflammation* 37:1889–1894.

doi:10.1007/s10753-014-9920-3

D'haene B, Mestdagh P, Hellems J, Vandesompele J (2012) miRNA Expression Profiling: From Reference Genes to Global Mean Normalization Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology. *Humana Press*, S 261–272

Da Oh Y, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM (2010) GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142:687–698.

doi:10.1016/j.cell.2010.07.041

Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, Singer A, Postlethwait JH (2015) miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends in genetics : TIG* 31:613–626.

doi:10.1016/j.tig.2015.09.002

Ding J, Li X, Hu H (2016) TarPmiR: a new approach for microRNA target site prediction. *Bioinformatics (Oxford, England)* 32:2768–2775.

doi:10.1093/bioinformatics/btw318

Ding X, Wang X, Zhu X, Zhang J, Zhu Y, Shao X, Zhou X (2020) JNK/AP1 Pathway Regulates MYC Expression and BCR Signaling through Ig Enhancers in Burkitt Lymphoma Cells. *Journal of Cancer* 11:610–618. doi:10.7150/jca.34055

Dueck A, Eichner A, Sixt M, Meister G (2014) A miR-155-dependent microRNA hierarchy in dendritic cell maturation and macrophage activation. *FEBS letters* 588:632–640. doi:10.1016/j.febslet.2014.01.009

Dweep H, Gretz N (2015) miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods* 12:697. doi:10.1038/nmeth.3485

Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N (2011) miRWalk—database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *Journal of biomedical informatics* 44:839–847. doi:10.1016/j.jbi.2011.05.002

Dweep H, Gretz N, Sticht C (2014) miRWalk Database for miRNA–Target Interactions RNA Mapping. *Humana Press*, New York, NY, S 289–305

Ekins S, Mestres J, Testa B (2007) In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British journal of pharmacology* 152:9–20.

doi:10.1038/sj.bjp.0707305

- Essandoh K, Li Y, Huo J, Fan G-C (2016) MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock* (Augusta, Ga.) 46:122–131. doi:10.1097/SHK.0000000000000604
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9:102–114. doi:10.1038/nrg2290
- Fric J, Zelante T, Wong AYW, Mertes A, Yu H-B, Ricciardi-Castagnoli P (2012) NFAT control of innate immunity. *Blood* 120:1380–1389. doi:10.1182/blood-2012-02-404475
- Ghorpade DS, Leyland R, Kurowska-Stolarska M, Patil SA, Balaji KN (2012) MicroRNA-155 is required for *Mycobacterium bovis* BCG-mediated apoptosis of macrophages. *Molecular and cellular biology* 32:2239–2253. doi:10.1128/MCB.06597-11
- Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, Bertone P, Caldas C (2010) Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA* 16:991–1006. doi:10.1261/rna.1947110
- Graff JW, Dickson AM, Clay G, McCaffrey AP, Wilson ME (2012) Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes. *The Journal of biological chemistry* 287:21816–21825. doi:10.1074/jbc.M111.327031
- Griffiths-Jones S (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32:D109-11. doi:10.1093/nar/gkh023
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34:D140-4. doi:10.1093/nar/gkj112
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36:D154-8. doi:10.1093/nar/gkm952
- Griffiths-Jones S, Hui JHL, Marco A, Ronshaugen M (2011) MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO reports* 12:172–177. doi:10.1038/embor.2010.191
- Hatzi K, Nance JP, Kroenke MA, Bothwell M, Haddad EK, Melnick A, Crotty S (2015) BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms. *J Exp Med* 212:539–553. doi:10.1084/jem.20141380

- Hellwing C, Schoeniger A, Roessler C, Leimert A, Schumann J (2018) Lipid raft localization of TLR2 and its co-receptors is independent of membrane lipid composition. *PeerJ* 6:e4212. doi:10.7717/peerj.4212
- Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, Vessella RL, Tewari M (2013) Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature methods* 10:1003–1005. doi:10.1038/nmeth.2633
- Hirschberger S, Hübner M, Strauß G, Effinger D, Bauer M, Weis S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kreth S (2019) Identification of suitable controls for miRNA quantification in T-cells and whole blood cells in sepsis. *Sci Rep* 9:15735. doi:10.1038/s41598-019-51782-w
- Hop HT, Arayan LT, Huy TXN, Reyes AWB, Vu SH, Min W, Lee HJ, Rhee MH, Chang HH, Kim S (2018) The Key Role of c-Fos for Immune Regulation and Bacterial Dissemination in Brucella Infected Macrophage. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8:287. doi:10.3389/fcimb.2018.00287
- Hu F, Dong X, Li W, Lv J, Lin F, Song G, Hou G, Li R (2021) miR-351-5p aggravates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting AMPK. *Molecular medicine reports* 24. doi:10.3892/mmr.2021.12330
- Huang F, Zhao J-L, Wang L, Gao C-C, Liang S-Q, An D-J, Bai J, Chen Y, Han H, Qin H-Y (2017) miR-148a-3p Mediates Notch Signaling to Promote the Differentiation and M1 Activation of Macrophages. *Frontiers in Immunology* 8:1327. doi:10.3389/fimmu.2017.01327
- Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, Hellemans J, Kubista M, Mueller RD, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT, Bustin SA (2013) The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical chemistry* 59:892–902. doi:10.1373/clinchem.2013.206375
- Innes JK, Calder PC (2018) Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 132:41–48. doi:10.1016/j.plefa.2018.03.004
- Jennewein C, Knethen A von, Schmid T, Brüne B (2010) MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mRNA destabilization. *The Journal of biological chemistry* 285:11846–11853. doi:10.1074/jbc.M109.066399
- Jonas S, Izaurrealde E (2015) Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature reviews. Genetics* 16:421–433. doi:10.1038/nrg3965

Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Szargiej P, Myśliwska J (2015) Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)* 69:496–502. doi:10.5604/17322693.1150133

Kawano A, Ariyoshi W, Yoshioka Y, Hikiji H, Nishihara T, Okinaga T (2019) Docosahexaenoic acid enhances M2 macrophage polarization via the p38 signaling pathway and autophagy. *Journal of cellular biochemistry* 120:12604–12617. doi:10.1002/jcb.28527

Kiseleva YY, Ptitsyn KG, Radko SP, Zgoda VG, Archakov AI (2016) Droplet digital PCR, a prospective technological approach to quantitative profiling of microRNA. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B* 10:22–30. doi:10.1134/S199075081601008X

Kolbert CP, Feddersen RM, Rakhshan F, Grill DE, Simon G, Middha S, Jang JS, Simon V, Schultz DA, Zschunke M, Lingle W, Carr JM, Thompson EA, Oberg AL, Eckloff BW, Wieben ED, Li P, Yang P, Jen J (2013) Multi-platform analysis of microRNA expression measurements in RNA from fresh frozen and FFPE tissues. *PloS one* 8:e52517. doi:10.1371/journal.pone.0052517

Kong W, Zhao J-J, He L, Cheng JQ (2009) Strategies for profiling microRNA expression. *Journal of cellular physiology* 218:22–25. doi:10.1002/jcp.21577

Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 47:D155-D162. doi:10.1093/nar/gky1141

Kuhlmann K, Cieselski M, Schumann J (2021) Relative versus absolute RNA quantification: a comparative analysis based on the example of endothelial expression of vasoactive receptors. *Biological procedures online* 23:6. doi:10.1186/s12575-021-00144-w

Lawrence T, Natoli G (2011) Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 11:750–761. doi:10.1038/nri3088

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843–854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y

Lewandowska-Sabat AM, Hansen SF, Solberg TR, Østerås O, Heringstad B, Boysen P, Olsaker I (2018) MicroRNA expression profiles of bovine monocyte-derived macrophages infected in vitro with two strains of *Streptococcus agalactiae*. *BMC Genomics* 19:241. doi:10.1186/s12864-018-4591-3

- Li Y, Shi X (2013) MicroRNAs in the regulation of TLR and RIG-I pathways. *Cell Mol Immunol* 10:65–71. doi:10.1038/cmi.2012.55
- Li X, Feng S, Luo Y, Long K, Lin Z, Ma J, Jiang A, Jin L, Tang Q, Li M, Wang X (2018) Expression profiles of microRNAs in oxidized low-density lipoprotein-stimulated RAW 264.7 cells. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 54:99–110. doi:10.1007/s11626-017-0225-3
- Link F, Krohn K, Schumann J (2019) Identification of stably expressed housekeeping miRNAs in endothelial cells and macrophages in an inflammatory setting. *Sci Rep* 9:12786. doi:10.1038/s41598-019-49241-7
- Liu J, Jennings SF, Tong W, Hong H (2011) Next generation sequencing for profiling expression of miRNAs: technical progress and applications in drug development. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 4:666–676. doi:10.4236/jbise.2011.410083
- Lu L, McCurdy S, Huang S, Zhu X, Peplowska K, Tiirikainen M, Boisvert WA, Garmire LX (2016) Time Series miRNA-mRNA integrated analysis reveals critical miRNAs and targets in macrophage polarization. *Sci Rep* 6:37446. doi:10.1038/srep37446
- Luan B, Yoon Y-S, Le Lay J, Kaestner KH, Hedrick S, Montminy M (2015) CREB pathway links PGE2 signaling with macrophage polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:15642–15647. doi:10.1073/pnas.1519644112
- Macián F, López-Rodríguez C, Rao A (2001) Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20:2476–2489. doi:10.1038/sj.onc.1204386
- Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 6:13. doi:10.12703/P6-13
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008) Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:453–461. doi:10.2741/2692
- McCormick SM, Heller NM (2015) Regulation of Macrophage, Dendritic Cell, and Microglial Phenotype and Function by the SOCS Proteins. *Frontiers in Immunology* 6:549. doi:10.3389/fimmu.2015.00549
- Mestdagh P, van Vlierberghe P, an de Weer, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 10:R64. doi:10.1186/gb-2009-10-6-r64

- Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L et al (2014) Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nature methods* 11:809–815. doi:10.1038/nmeth.3014
- Mlecnik B, Galon J, Bindea G (2019) Automated exploration of gene ontology term and pathway networks with ClueGO-REST. *Bioinformatics (Oxford, England)* 35:3864–3866. doi:10.1093/bioinformatics/btz163
- Murray D, Doran P, MacMathuna P, Moss AC (2007) In silico gene expression analysis—an overview. *Molecular Cancer* 6:50. doi:10.1186/1476-4598-6-50
- Nahid MA, Satoh M, Chan EK (2011) MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol* 8:388–403. doi:10.1038/cmi.2011.26
- O’Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D (2007) MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:1604–1609. doi:10.1073/pnas.0610731104
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M (1999) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic acids research* 27:29–34. doi:10.1093/nar/27.1.29
- O’Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE (2011) MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 11:163–175. doi:10.1038/nri2957
- Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K (2019) Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in Immunology* 10:1084. doi:10.3389/fimmu.2019.01084
- Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR (2012) Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal. Chem.* 84:1003–1011. doi:10.1021/ac202578x
- Pop M, Salzberg SL (2008) Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends in genetics : TIG* 24:142–149. doi:10.1016/j.tig.2007.12.006
- Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M (2012) MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature reviews. Genetics* 13:358–369. doi:10.1038/nrg3198
- Rao A, Luo C, Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual review of immunology* 15:707–747. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.707



- Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N (2011) Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 80:193–208. doi:10.1016/j.critrevonc.2010.11.004
- Riechert G, Maucher D, Schmidt B, Schumann J (2022) miRNA-Mediated Priming of Macrophage M1 Differentiation Differs in Gram-Positive and Gram-Negative Settings. *Genes* 13. doi:10.3390/genes13020211
- Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, Rosenthal N, Nerlov C (2009) A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:17475–17480. doi:10.1073/pnas.0908641106
- Safran M, Rosen N, Twik M, BarShir R, Stein TI, Dahary D, Fishilevich S, Lancet D (2021) *The GeneCards Suite Practical Guide to Life Science Databases*. Springer, Singapore, S 27–56
- Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH (2019) An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of cellular physiology* 234:5451–5465. doi:10.1002/jcp.27486
- Sarode P, Zheng X, Giotopoulou GA, Weigert A, Kuenne C, Günther S, Friedrich A, Gattenlöhner S, Stiewe T, Brüne B, Grimminger F, Stathopoulos GT, Pullamsetti SS, Seeger W, Savai R (2020) Reprogramming of tumor-associated macrophages by targeting  $\beta$ -catenin/FOSL2/ARID5A signaling: A potential treatment of lung cancer. *Science advances* 6:eaaz6105. doi:10.1126/sciadv.aaz6105
- Schlosser K, McIntyre LA, White RJ, Stewart DJ (2015) Customized Internal Reference Controls for Improved Assessment of Circulating MicroRNAs in Disease. *PloS one* 10:e0127443. doi:10.1371/journal.pone.0127443
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 46:69–81. doi:10.1016/S0165-022X(00)00129-9
- Schnitger AKD, Machova A, Mueller RU, Androulidaki A, Schermer B, Pasparakis M, Krönke M, Papadopoulou N (2011) *Listeria monocytogenes* infection in macrophages induces vacuolar-dependent host miRNA response. *PloS one* 6:e27435. doi:10.1371/journal.pone.0027435
- Schoeniger A, Adolph S, Fuhrmann H, Schumann J (2011) The impact of membrane lipid composition on macrophage activation in the immune defense against

- Rhodococcus equi and Pseudomonas aeruginosa. International journal of molecular sciences 12:7510–7528. doi:10.3390/ijms12117510
- Schoeniger A, Fuhrmann H, Schumann J (2016) LPS- or Pseudomonas aeruginosa-mediated activation of the macrophage TLR4 signaling cascade depends on membrane lipid composition. PeerJ 4:e1663. doi:10.7717/peerj.1663
- Schumann J (2016) Does plasma membrane lipid composition impact the miRNA-mediated regulation of vascular inflammation? Medical Hypotheses 88:57–59. doi:10.1016/j.mehy.2016.01.012
- Schumann J, Leichtle A, Thiery J, Fuhrmann H (2011) Fatty acid and peptide profiles in plasma membrane and membrane rafts of PUFA supplemented RAW264.7 macrophages. PloS one 6:e24066. doi:10.1371/journal.pone.0024066
- Serhan CN, Chiang N, van Dyke TE (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nat Rev Immunol 8:349–361. doi:10.1038/nri2294
- Shahidi F, Ambigaipalan P (2018) Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. Annual review of food science and technology 9:345–381. doi:10.1146/annurev-food-111317-095850
- Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A (2018) Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. Journal of cellular physiology 233:6425–6440. doi:10.1002/jcp.26429
- Shi Y, Zhang B, Zhu J, Huang W, Han B, Wang Q, Qi C, Wang M, Liu F (2020) miR-106b-5p Inhibits IRF1/IFN- $\beta$  Signaling to Promote M2 Macrophage Polarization of Glioblastoma. OncoTargets and therapy 13:7479–7492. doi:10.2147/OTT.S238975
- Sica A, Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. The Journal of clinical investigation 122:787–795. doi:10.1172/JCI59643
- Siddika T, Heinemann IU (2020) Bringing MicroRNAs to Light: Methods for MicroRNA Quantification and Visualization in Live Cells. Front. Bioeng. Biotechnol. 8:619583. doi:10.3389/fbioe.2020.619583
- Sticht C, La Torre C de, Parveen A, Gretz N (2018) miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. PloS one 13:e0206239. doi:10.1371/journal.pone.0206239

- Takeda K, Akira S (2004) TLR signaling pathways. *Seminars in immunology* 16:3–9. doi:10.1016/j.smim.2003.10.003
- Takeda K, Akira S (2015) Toll-like receptors. *Current protocols in immunology* 109:14.12.1-14.12.10. doi:10.1002/0471142735.im1412s109
- Tanaka A, To J, O'Brien B, Donnelly S, Lund M (2017) Selection of reliable reference genes for the normalisation of gene expression levels following time course LPS stimulation of murine bone marrow derived macrophages. *BMC Immunology* 18:43. doi:10.1186/s12865-017-0223-y
- Tania Nolan, Jim Huggett, Elena Sanchez, Rebecca Sanders, Nicholas Redshaw, Tim Wilkes (2013) Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR)
- Vartanian R, Masri J, Martin J, Cloninger C, Holmes B, Artinian N, Funk A, Ruegg T, Gera J (2011) AP-1 regulates cyclin D1 and c-MYC transcription in an AKT-dependent manner in response to mTOR inhibition: role of AIP4/Itch-mediated JUNB degradation. *Mol Cancer Res* 9:115–130. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0105
- Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, Vaporidi K, Tsatsanis C (2017) Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 198:1006–1014. doi:10.4049/jimmunol.1601515
- Verschoor CP, Dorrington MG, Novakowski KE, Kaiser J, Radford K, Nair P, Anipindi V, Kaushic C, Surette MG, Bowdish DME (2014) MicroRNA-155 is required for clearance of *Streptococcus pneumoniae* from the nasopharynx. *Infection and immunity* 82:4824–4833. doi:10.1128/IAI.02251-14
- Vesely PW, Staber PB, Hoefler G, Kenner L (2009) Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutation research* 682:7–12. doi:10.1016/j.mrrev.2009.01.001
- Waehler R (2021) Fatty acids: facts vs. fiction. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*:1–21. doi:10.1024/0300-9831/a000713
- Walloschke B, Fuhrmann H, Schumann J (2010) Enrichment of RAW264.7 macrophages with essential 18-carbon fatty acids affects both respiratory burst and production of immune modulating cytokines. *The Journal of nutritional biochemistry* 21:556–560. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.03.007

- Wang C, Ding Q, Plant P, Basheer M, Yang C, Tawedrous E, Krizova A, Boulos C, Farag M, Cheng Y, Yousef GM (2019) Droplet digital PCR improves urinary exosomal miRNA detection compared to real-time PCR. *Clinical biochemistry* 67:54–59. doi:10.1016/j.clinbiochem.2019.03.008
- Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS (2010) The role of the transcription factor CREB in immune function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185:6413–6419. doi:10.4049/jimmunol.1001829
- Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ (2015) PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University* 24:931–941. doi:10.17219/acem/31243
- Willenbrock H, Salomon J, Søkilde R, Barken KB, Hansen TN, Nielsen FC, Møller S, Litman T (2009) Quantitative miRNA expression analysis: comparing microarrays with next-generation sequencing. *RNA* 15:2028–2034. doi:10.1261/rna.1699809
- Wilson HM (2014) SOCS Proteins in Macrophage Polarization and Function. *Frontiers in Immunology* 5:357. doi:10.3389/fimmu.2014.00357
- Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39:75–85. doi:10.2144/05391RV01
- Xu Y, Jin H, Yang X, Wang L, Su L, Liu K, Gu Q, Xu X (2014) MicroRNA-93 inhibits inflammatory cytokine production in LPS-stimulated murine macrophages by targeting IRAK4. *FEBS letters* 588:1692–1698. doi:10.1016/j.febslet.2014.03.013
- Yu B (2008) *Gene Discovery Clinical Bioinformatics*. Humana Press, S 1–22
- Zhang C, Bai N, Chang A, Zhang Z, Yin J, Shen W, Tian Y, Xiang R, Liu C (2013a) ATF4 is directly recruited by TLR4 signaling and positively regulates TLR4-triggered cytokine production in human monocytes. *Cell Mol Immunol* 10:84–94. doi:10.1038/cmi.2012.57
- Zhang Y, Zhang M, Zhong M, Suo Q, Lv K (2013b) Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. *International journal of molecular medicine* 31:797–802. doi:10.3892/ijmm.2013.1260
- Zhao J, Chen C, Guo M, Tao Y, Cui P, Zhou Y, Qin N, Zheng J, Zhang J, Xu L (2016) MicroRNA-7 Deficiency Ameliorates the Pathologies of Acute Lung Injury through Elevating KLF4. *Frontiers in Immunology* 7:389. doi:10.3389/fimmu.2016.00389

Zheng Z, Ge Y, Zhang J, Xue M, Li Q, Lin D, Ma W (2015) PUFA diets alter the microRNA expression profiles in an inflammation rat model. *Molecular medicine reports* 11:4149–4157. doi:10.3892/mmr.2015.3318

Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, Li J (2014) Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cellular signalling* 26:192–197. doi:10.1016/j.cellsig.2013.11.004

## 8. Thesen

1. Gram-positive Stimulation von Makrophagen resultiert erwiesenermaßen in M1-Differenzierung. Die wichtigsten beteiligten Signalkaskaden sind der RAC1-PI3K-Akt-Signalweg und der MYD88-abhängige Signalweg, durch welche die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB aktiviert werden.
2. Die Gene der miRNAs miR-7a-5p, miR-148a-3p und miR-155-5p enthalten Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP-1. Eine gram-positive Stimulation von Makrophagen geht folglich mit einer verstärkten Expression dieser miRNAs einher.
3. Die hochregulierten miRNAs zielen auf die Expression von Schlüsselinhibitoren des RAC1-PI3K-Akt-Signalwegs und des MYD88-abhängigen Signalwegs. Dies ist der erste Hinweis auf einen selbstverstärkenden Effekt dieser Signalkaskaden durch einen miRNA-vermittelten Mechanismus.
4. Eine miRNA-vermittelte Interaktion mit diesen Signalkaskaden wird auch bei gram-negativer Stimulation von Makrophagen beobachtet. In diesem Fall kommt es jedoch zu einer Herabregulation einer Gruppe von miRNAs, die auf Schlüsselmediatoren der Signalkaskaden abzielen. Der Mechanismus der miRNA-vermittelten Aktivierung der M1-Differenzierung unterscheidet sich also im gram-positiven und gram-negativen Milieu und beruht auf unterschiedlichen miRNAs.
5. PUFA-angereicherte Makrophagen differenzieren sich bei gram-positiver Stimulation zum M2-Phänotyp. Allerdings hat die PUFA-Supplementierung nur geringe Konsequenzen auf das zelluläre miRNA-Profil. Es gibt also keine Hinweise darauf, dass miRNAs an der PUFA-induzierten Verschiebung der Makrophagendifferenzierung von M1 zu M2 beteiligt sind. Ähnliche Ergebnisse wurden in den Studien der Arbeitsgruppe im gram-negativen Milieu beobachtet.

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbständigkeitserklärung mit Unterschrift**

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

24.05.2023, Georg Riechert

## **Danksagung**

Ich möchte meine Dankbarkeit gegenüber dem Forschungslabor der Klinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Halle (Saale) und dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie sowie deren engagierten Mitarbeitern ausdrücken.

Ein besonderer Dank gebührt Frau apl. Prof. Dr. rer. nat. habil. Julia Schumann, die mich hervorragend bei der Planung, Durchführung und Umsetzung dieser Arbeit betreut hat.

Zusätzlich möchte ich Frau Claudia Rößler, wissenschaftliche Mitarbeiterin des Forschungslabors, für ihre Unterstützung bei der Kultivierung der Zellen sowie Herrn Markus Glaß, Mitarbeiter der Core Facility Imaging der Martin-Luther-Universität Halle, für die Aufbereitung der Sequenzierungsdaten, die durch die Firma Novogene ermittelt wurden, meinen Dank aussprechen.