Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

# Einfluss eines pro-inflammatorischen Milieus auf die microRNA-Expression in Aorten septischer Mäuse, murinen Makrophagen und humanen Endothelzellen

## Dissertation

zum Erlangen des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.) für das Fachgebiet Anästhesie

## vorgelegt

### der Medizinischen Fakultät

## der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Birte Schmidt

geboren am 13.09.1990 in Frankfurt am Main

Betreuerin: PD Dr. rer. nat. Julia Schumann

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. med. Michael Bucher
- 2. Prof Dr. med. Michael Bauer (Universitätsklinikum Jena)

08.10.2019

04.03.2020

#### Referat

Septische Erkrankungen stellen ein bedeutendes intensivmedizinisches Problem dar. Einer tendenziell steigendenden Inzidenz stehen eingeschränkte therapeutische Möglichkeiten gegenüber. In der Folge geht die Sepsis mit einer erheblichen Mortalität einher. Es besteht daher eine dringende Indikation die der Sepsis zu Grunde liegenden Pathomechanismen auf molekularer Ebene aufzudecken. Ein interessanter Ansatzpunkt ist die Sepsis-bedingt veränderte Expression von miRNAs. miRNAs fungieren als Regulatoren der Proteinbiosynthese und werden zum einen als potenzielle neue Sepsis-Biomarker und zum anderen als mögliche neue Therapeutika diskutiert. Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis, welche miRNAs im Rahmen einer Sepsis zell- und gewebespezifisch verändert exprimiert werden. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel in Aorten septischer Mäuse sowie in pro-inflammatorisch exponierten Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen mittels eines umfassenden zweifachen Screenings in Kombination mit einer ddPCR-basierten Validierung differenziell exprimierte miRNAs zu identifizieren. Des Weiteren wurden mittels in silico-Analyse die Sepsis-assoziierten Zielgene validierter miRNAs ermittelt, um auf Basis der gewonnenen Daten eine Übersicht der putativen Wirkmechanismen der miRNAs zu erstellen. Beim Screening wurde basierend auf übereinstimmenden Daten von NGS- und NanoString-Untersuchungen für die Aorten septischer Mäuse 4 miRNAs, für die LPS-stimulierten murinen Monozyten/Makrophagen (Zelllinie RAW264.7) 9 miRNAs und für die Zytokin-stimulierten humanen Endothelzellen (Zelllinie TIME) 13 miRNAs als Validierungs-Kandidaten ausgewählt. Hiervon konnten mittels ddPCR 7 miRNAs (LPS-stimulierte RAW264.7) bzw. 6 miRNAs (Zytokin-stimulierte TIME) als signifikant in ihrer Expression verändert bestätigt werden. Bei 2 der 7 validierten murinen sowie 3 der 6 validierten humanen miRNAs handelt es sich um eine Erstbeschreibung einer LPS- bzw. Zytokin-induzierten Expressionsänderung in den jeweiligen Zelltypen. Die in silico-Analyse der differenziell exprimierten miRNAs ergab eine Vielzahl putativer Wirkmechanismen im Rahmen der Pathophysiologie einer Sepsis, die es in weiterführenden Untersuchungen zu spezifizieren gilt. So sind die identifizierten murinen miRNAs mit dem TLR- und dem MAP-Kinase-Signalweg sowie der Apoptose assoziiert. Bei den validierten humanen miRNAs fanden sich Assoziationen mit dem JAK-STAT-, dem IL-1-, dem TNF- und dem MAP-Kinase-Signalweg, der Apoptose, der endothelialen Dysfunktion sowie der Expression vasoaktiver Rezeptoren.

Schmidt, Birte: Einfluss eines pro-inflammatorischen Milieus auf die microRNA-Expression in Aorten septischer Mäuse, murinen Makrophagen und humanen Endothelzellen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 74 Seiten, 2019

# I Inhaltsverzeichnis

| 1     | Einleitung1                                |
|-------|--|
| 1.1   | Entzündung1                                |
| 1.1.1 | Pathophysiologie einer lokalen Entzündung1 |
| 1.1.2 | Sepsis3                                    |
| 1.1.3 | Pathophysiologie einer Sepsis4             |
| 1.2   | Genexpression und -regulation5             |
| 1.3   | miRNAs5                                    |
| 1.3.1 | miRNA-Nomenklatur7                         |
| 1.3.2 | miRNA-Analyse                              |
| 1.3.3 | In silico-Analyse10                        |
| 1.4   | miRNAs und Sepsis11                        |
| 2     | Zielstellung14                             |
| 3     | Material und Methoden15                    |
| 3.1   | Material15                                 |
| 3.1.1 | Geräte15                                   |
| 3.1.2 | Verbrauchsmaterialien16                    |
| 3.1.3 | Chemikalien & Lösungen17                   |
| 3.1.4 | Zytokine & Wachstumsfaktoren18             |
| 3.1.5 | Verwendete Organismen/Zelllinien18         |
| 3.1.6 | Kits                                       |
| 3.1.7 | Synthetische Oligonukleotide19             |
| 3.1.8 | Zellkulturmedien                           |
| 3.1.9 | Software & Datenbanken                     |
| 3.2   | Methoden21                                 |
| 3.2.1 | Zellkultivierung und -stimulierung21       |
| 3.2.2 | Gewinnung von murinen Aorten21             |
| 3.2.3 | RNA-Isolierung                             |

| 3.2.4 | RNA-Konzentrationsmessung22                       |
|-------|---|
| 3.2.5 | miRNA-Screening22                                 |
| 3.2.6 | miRNA-Validierung24                               |
| 3.2.7 | In silico-Analyse                                 |
| 3.2.8 | Statistische Auswertung                           |
| 4     | Ergebnisse  |
| 4.1   | RNA-Konzentration und -Reinheit                   |
| 4.2   | Screening   |
| 4.2.1 | Aorten isoliert aus C57BL/6J-Mäusen26             |
| 4.2.2 | Murine Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.728 |
| 4.2.3 | Humane Endothelzelllinie TIME31                   |
| 4.3   | Validierung                                       |
| 4.3.1 | Aorten isoliert aus C57BL/6J-Mäusen33             |
| 4.3.2 | Murine Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7   |
| 4.3.3 | Humane Endothelzelllinie TIME                     |
| 4.4   | In silico-Analyse                                 |
| 4.4.1 | Aorten isoliert aus C57BL/6J-Mäusen37             |
| 4.4.2 | Murine Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7   |
| 4.4.3 | Humane Endothelzelllinie TIME41                   |
| 5     | Diskussion46                                      |
| 6     | Zusammenfassung56                                 |
| 7     | Literaturverzeichnis                              |
| 8     | Thesen  |
| 9     | Anlagen72   |

# II Abbildungsverzeichnis

| Abbildung 1) miRNA-Synthese im Überblick   | 7  |
|--|----|
| Abbildung 2) miRNA-Nomenklatur am Beispiel hsa-miR-30e-3p                                | 8  |
| Abbildung 3) Aorten (C57BL/6J-Mäuse): miRNA-Abundanz                                     | 26 |
| Abbildung 4) RAW264.7: miRNA-Abundanz.   | 29 |
| Abbildung 5) TIME: miRNA-Abundanz  | 32 |
| Abbildung 6) miRNA-Expression in Aorten (C57BL/6-Mäuse)                                  | 34 |
| Abbildung 7) miRNA-Expression muriner Monozyten/Makrophagen (RAW264.7)                   | 35 |
| Abbildung 8) miRNA-Expression humaner Endothelzellen (TIME)                              | 37 |
| Abbildung 9) Zielgene validierter muriner miRNAs: TLR-4- und MAPK-Signalweg, Apoptose    | 40 |
| Abbildung 10) Zielgene validierter humaner miRNAs: JAK-STAT-Signalweg                    | 42 |
| Abbildung 11) Zielgene validierter humaner miRNAs: IL-1-, TNF-, MAPK-Signalweg, Apoptose | 44 |
| Abbildung 12) Zielgene validierter humaner miRNAs: vasoaktive Rezeptoren                 | 45 |

# III Tabellenverzeichnis

| Tabelle 1) Aorten (C57BL/6J-Mäuse): miRNAs mit Sepsis-induziert veränderter Expression      | 28 |
|---|----|
| Tabelle 2) RAW264.7: miRNAs mit LPS-induziert veränderter Expression                        | 30 |
| Tabelle 3) TIME: miRNAs mit Zytokin-induziert veränderter Expression                        | 33 |
| Tabelle 4) Anzahl mittels miRWalk2.0 identifizierter Zielgene validierter muriner miRNAs    | 38 |
| Tabelle 5) Anzahl mittels miRWalk2.0 identifizierter Zielgene validierter humaner miRNAs    | 41 |
| Tabelle 6) C57BL/6J-Aorten: Detektionslimit (>100 Reads) nur bei 1 Verfahren überschritten. | 72 |
| Tabelle 7) RAW264.7: Detektionslimit (>100 Reads) nur bei 1 Verfahren überschritten         | 72 |
| Tabelle 8) RAW264.7: Analyse ausschließlich mittels NGS-Verfahren                           | 72 |
| Tabelle 9) TIME: Detektionslimit (>100 Reads) nur bei 1 Verfahren überschritten             | 73 |
| Tabelle 10) TIME: Analyse ausschließlich mittels NGS-Verfahren.                             | 74 |

### IV Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

- °C Celsius ADRA1A Adrenozeptor alpha-1A ADRA1B Adrenozeptor alpha-1B ADRA1D Adrenozeptor alpha-1D AGTR1 Angiotensin II Rezeptor Typ 1 AGTRAP Angiotensin II Rezeptor Typ 1-assoziiertes Protein AVPR1A Arginin Vasopressin Rezeptor 1A BAD BCL-2 Associated Agonist Of Cell Death BAK1 BCL-2 Antagonist/Killer-1 BAX BCL-2 Associated-X B-Cell Leukemia-2 BCL-2 BCL2 Like Protein-2 BCL-2L BCLAF1 BCL2-associated Transcription Factor-1 BID BH3 Interacting Domain Death Agonist Ca<sup>2+</sup> Kalziumkation CCL CC-Chemokinligand komplementäre DNA cDNA Zentimeter cm  $\rm cm^2$ Quadratzentimeter Kohlenstoffdioxid  $CO_2$ COX Cyclooxygenase  $\mathsf{Droplet}\;\mathsf{Digital}^{\mathsf{TM}}\;\mathsf{PCR}$ ddPCR
- DIC Disseminated Intravascular Coagulation

| EGF      | epidermaler Wachstumsfaktor                              |
|----------|--|
| eNOS     | endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase                  |
| ERK      | Extracellular-Signal Regulated Kinase                    |
| ET       | Endothelin   |
| FADD     | Fas-Associated Death Domain                              |
| FGF      | Fibroblast Growth Factor                                 |
| FKS      | fetales Kälberserum                                      |
| FOSB     | FBJ Osteosarcoma Oncogene B                              |
| FOSL-1   | FOS Like-1   |
| fov      | field of view  |
| g        | Gramm  |
| GO       | Gene Ontology  |
| GOrilla  | Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool |
| $H_2O_2$ | Wasserstoffperoxid                                       |
| hsa      | Homo sapiens (human)                                     |
| HPMECs   | humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen           |
| HUVECs   | humane umbilikale venöse Endothelzellen                  |
| i.p.     | intraperitoneal  |
| lκB      | Nuclear Factor κΒ Inhibitor                              |
| ICAM-1   | Intercellular Adhesion Molecule-1                        |
| IGF-1    | Insulin-like Growth Factor-1                             |
| ΙΚΑΡ     | IKK-assoziiertes Protein-1                               |
| ІКК      | Inhibitor ĸB Kinase                                      |
| IL       | Interleukin  |
| IL-1β    | Interleukin-1-beta                                       |

| IL1RA            | Interleukin-1 Rezeptor Antagonist           |
|------------------|---|
| IL1RAP           | Interleukin-1 Rezeptor-assoziiertes Protein |
| IL6R             | Interleukin 6 Rezeptor                      |
| IL10RA           | Interleukin 10 Rezeptor Subunit-alpha       |
| IL10RB           | Interleukin 10 Rezeptor Subunit-beta        |
| INF-γ            | Interferon-gamma                            |
| INFGR            | Interferon-gamma-Rezeptor                   |
| iNOS             | induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase     |
| IRAK             | Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase   |
| IRF              | Interferon Regulatory Factor                |
| JAK              | Januskinase                                 |
| JNK              | C-Jun-N-terminale Kinase                    |
| JUN              | Jun Proto-Onkogen                           |
| JUNB             | JunB Proto-Onkogen                          |
| kg               | Kilogramm                                   |
| I                | Liter                                       |
| LPS              | Lipopolysaccharide                          |
| МАРК             | Mitogen-Activated Protein-Kinase            |
| MAPK8IP2         | MAPK-8 interagierendes Protein-2            |
| mg               | Milligramm                                  |
| Mg <sup>2+</sup> | Magnesiumkation                             |
| min              | Minute                                      |
| mRNA             | messenger RNA                               |
| miR              | reife miRNA                                 |
| miRNA            | microRNA                                    |

miRISC miRNA-containing RISC

- miRQC microRNA Quality Control
- MK MAP Kinase-aktivierte Protein Kinase
- ml Milliliter
- mM Millimolar
- mm Millimeter
- mmHg Millimeter Quecksilbersäule
- mHG Minimum-Hypergeometric
- mmu Mus musculus (murin)
- MyD88 Myloid Differentiation Primary Response Gene 88
- N biologische Replikate
- n technische Replikate
- ncRNAs non-coding RNA
- NFκB Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells
- ng Nanogramm
- NGS Next Generation Sequencing
- nm Nanometer
- NO Stickstoffmonoxid
- NOX NADPH-Oxidase
- PAI Plasminogen Activator Inhibitor
- PAMP Pathogen-Associated Molecular Pattern
- PBMC Peripheral Mononuclear Cells
- PBS Phosphate-Buffered Saline
- PCR Polymerase Chain Reaction
- PGI2 Prostacyclin

| pre-miRNA | Vorläufer-microRNA                                   |
|-----------|--|
| pri-miRNA | primäre microRNA                                     |
| PRR       | Pattern Recognition Receptor                         |
| qSOFA     | quick Sepsis Related Organ Failure Assessment        |
| RISC      | RNA-induced Silencing Complex                        |
| RFL       | Reporter Library File                                |
| RNA       | Ribonucleic Acid                                     |
| RT        | Reverse Transkriptase                                |
| ROS       | Reactive Oxygen Species                              |
| S         | Sekunde  |
| SBS       | Sequencing By Synthesis                              |
| SOCS      | Suppressor Of Cytokine Signaling                     |
| SOD       | Superoxiddismutase                                   |
| STAT      | Signal Transducer and Activator of Transcription     |
| Tab.      | Tabelle  |
| ТАВ       | TAK1-bindendes Protein                               |
| ТАК       | Transforming Growth Factor $\beta$ -Activated Kinase |
| TFPI      | Tissue Factor Pathway Inhibitor                      |
| TGF-β     | Transforming Growth Factor-Beta                      |
| TIME      | Telomerase-Immortalized Microvascular Endothelial    |
| TLR       | Toll-Like Rezeptor                                   |
| TNF-α     | Tumornekrosefaktor-Alpha                             |
| TNFR1     | Tumornekrosefaktor Rezeptor-1                        |
| TRAF      | TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor                     |
| TRAF3IP2  | TRAF3-interagierendes Protein-2                      |

| U/min | Umdrehung pro | Minute |
|-------|---------------|--------|
|-------|---------------|--------|

- U6 nicht charakterisiertes Protein U6
- μg Mikrogramm
- μl Mikroliter
- v/v Volumen/Volumen %
- VCAM-1 Vascular Cell Adhesion Molecule-1
- VEC vaskuläre Endothelzellen
- VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
- w/o without
- w with
- x g relative Zentrifugalkraft

### 1 Einleitung

#### 1.1 Entzündung

Eine Entzündung ist eine körpereigene Reaktion auf schädliche Reize und zeigt sich klinisch durch fünf Kardinalzeichen: Rötung, Überwärmung, Schwellung, Schmerz und Funktionseinschränkung (Wolfgang Jelkmann 2011b). Ausgangspunkt ist typischerweise eine Gewebeschädigung. Diese geht mit einer lokalisierten kurzzeitigen Ischämie des betroffenen Gewebes und einer akuten Abnahme des Gefäßtonus in den Arterien einher (Wolfgang Jelkmann 2011a). Hieraus resultiert eine verstärkte Durchblutung, welche sich klinisch in einer lokalisierten Rötung und Überwärmung präsentiert. Weiterhin wird die Blutflussgeschwindigkeit vermindert, wodurch Immunzellen in das entzündete Gewebe einwandern können. Simultan zum erniedrigten Gefäßtonus in den Arterien nimmt der Gefäßtonus in den Venen zu (Lüllmann-Rauch 2009). Dies lässt den intravasalen Druck steigen und zeigt sich klinisch in einer lokalisierten Schwellung (Ralf Brandes 2011).

### 1.1.1 Pathophysiologie einer lokalen Entzündung

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion entsteht am Infektionsort durch eine verstärkte Durchblutung bei einer verringerten Blutflussgeschwindigkeit eine Matrix, die die Entfernung der Pathogene durch Immunzellen fördert (Lüllmann-Rauch 2009). Von besonderer Bedeutung sind die Zellen des unspezifischen Immunsystems, die mit Hilfe von speziellen Mustererkennungsrezeptoren (sog. Pattern Recognition Receptors (PRRs)) die Pathogene anhand spezieller Strukturen (sog. Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)) erkennen (Lüllmann-Rauch 2009). Zu diesen PRRs zählen u.a. die Toll-like Rezeptoren (TLR)-2 und -4, die Bestandteile der Zellwand gram-positiver bzw. gram-negativer Bakterien (Lipoteichonsäure bzw. Lipopolysaccharide (LPS)) binden (Kawai und Akira 2010). Ihre Stimulierung bewirkt über die Induzierung einer Signaltransduktionskaskade die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells (NFκB) und bedingt so eine Veränderung der Genexpression (Müller-Esterl 2018a)

Monozyten und Makrophagen sind Akteure des unspezifischen Immunsystems und können durch Bindung der PAMPs Pathogene erkennen und unschädlich machen (Sprenger und Gemsa 2014). Dabei werden zwei Mechanismen unterschieden: 1) die Phagozytose, bei der die Pathogene eingeschlossen und mittels einer intrazellulären Entladung von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species (ROS)) abgetötet werden (Müller-Esterl 2018a) und 2) die Degranulierung, bei der durch die Immunzellen antimikrobiellen Substanzen (u.a. ROS, Defensine, Lysozym) in den Extrazellularraum ausgeschüttet werden. Aktivierte Monozyten und Makrophagen bilden zudem als Antigen-präsentierende Zellen eine Verbindung zum spezifischen Immunsystem (Uhle et al. 2016) und wirken über die Synthese und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin (IL)-1-beta (IL-1 $\beta$ ) und IL-6, stimulierend auf weitere Immun- und Stromazellen (G.-D. Burchard 2016). Zu Beginn einer Infektion geht die TLR-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B mit einer Polarisierung der Makrophagen zum M1-Typ einher, welcher durch antimikrobielle Potenz und pro-inflammatorische Wirkung gekennzeichnet ist (Geissmann et al. 2010). Bei erfolgreicher Bekämpfung der eingedrungen Pathogene differenzieren sich die Makrophagen in der letzten Phase einer Entzündung in den M2-Typ und tragen durch Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine sowie der phagozytotischen Beseitigung von Debris zur Heilung bei (Uhle et al. 2016).

Neben den Immunzellen sind auch Stromazellen an der Entzündungsreaktion beteiligt. Zu diesen gehören die Endothelzellen, die eine wesentliche Rolle bei der Pathophysiologie der Sepsis einnehmen. Endothelzellen exprimieren diverse immun-relevante Rezeptoren (Ralf Brandes 2011). Hierzu zählen die TLR-4- und IL-1-Rezeptoren, die über die Aktivierung von NFκB zu einer vermehrten Expression pro-inflammatorischer Gene führen, die Zytokin-Rezeptoren der Klasse I, die über den sog. Januskinase (JAK)- Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)-Signalweg die Genexpression beeinflussen, und die Rezeptoren der TNF-Familie, deren Stimulation u.a. den programmierten Zelltod induzieren kann (Offermanns S. 2016c). Die Aktivierung der Endothelzellen durch bakterielle PAMPs bzw. pro-inflammatorische Zytokine bewirkt eine Verschiebung des Gleichgewichtes des Gerinnungssystems zugunsten der Koagulation mit dem Ziel, die Entzündungsreaktion lokal zu begrenzen und eine systemische Ausbreitung der Pathogene zu verhindern (Sprenger und Gemsa 2014). Dabei kommt es unter anderem zum Abbau von Bestandteilen der endothelialen Glykokalix, wie z.B. dem gerinnungshemmenden Heparansulfat (Uhle et al. 2016), der vermehrten Sezernierung von Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)-1 und zur Expression des pro-koagulatorischen Gewebefaktors auf der Endothelzelloberfläche (Sprenger und Gemsa 2014). Durch den Abbau der Glykokalix werden zudem Adhäsionsfaktoren, wie das P-Selektin, freigelegt (Uhle et al. 2016). Die Adhäsion von Immunzellen am zuvor anti-adhäsiven Endothel wird überdies durch die gesteigerte Synthese von E-Selektin, Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) gefördert. Dies ermöglicht die Diapedese von Immunzellen durch das Endothel und die Migration zum Entzündungsort (Offermanns S. 2016a). Ferner führt die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) in den Endothelzellen zu einem deutlichen Anstieg der Stickstoffmonoxid (NO)-Konzentration (Uhle et al. 2016). Zusammen mit Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), welches von der ebenfalls vermehrt exprimierten

Cyclooxygenase (COX)-2 produziert wird, induziert NO eine Vasodilatation der betroffenen Gefäße (Offermanns S. 2016b). Diese Vasodilatation verlangsamt den Blutfluss und erleichtert so die Leukozyten-Migration in das infizierte Gewebe (Uhle et al. 2016).

### 1.1.2 Sepsis

Eine Sepsis stellt eine generalisierte Entzündungsreaktion des menschlichen Organismus dar. Auslöser sind in der Regel gram-positive bzw. gram-negative Bakterien, in seltenen Fällen auch Pilze, Viren oder Parasiten (Richter et al. 2018). Entscheidend für den Krankheitsverlauf ist eine inadäquate Immunreaktion, durch die die ursprünglich lokale Infektion nicht eingedämmt werden kann (Uhle et al. 2016) (GantenD.É. Die pro-inflammatorischen Mediatoren, die von den Immunzellen freigesetzten werden, induzieren eine systemische Aktivierung des Endothels, die mit einer Störung der Endothelzellfunktion und der Blutgerinnung einhergeht. Diese endotheliale Dysfunktion in Verbindung mit der Aktivierung des Gerinnungssystems mündet in einer Mikrozirkulationsstörung, die auch nicht-infizierte Gewebe und Organe betrifft (Uhle et al. 2016). Hieraus resultiert ein progredientes Kreislaufversagen, begleitet von regionalen Verteilungsstörungen und einer beeinträchtigten Sauerstoffutilisation im Gewebe (Uhle et al. 2016) (Werdanetal.É. Kennzeichnend für eine Sepsis ist demzufolge eine lebensbedrohliche Organdysfunktion als Folge einer fehlregulierten Immunantwort auf eine mutmaßliche Infektion (Singer et al. 2016).

Die Sepsis-Diagnostik umfasst die Identifizierung des Infektionsherdes sowie des Erregers (mikrobiologische Untersuchung von Blutkulturen oder anderen Körperflüssigkeiten). Ferner erfolgen labordiagnostische Untersuchungen zur Erfassung der Entzündungszeichen und der Organfunktionen (Richter et al. 2018). Die aktuellen Therapieoptionen bestehen aus einer intensivmedizinischen Betreuung (Kreislaufstabilisierung mittels Volumentherapie und kreislaufwirksamen Substanzen) in Kombination mit einer möglichst frühzeitigen und gezielten Antibiotikabehandlung sowie einer adäquaten Fokussanierung. Die zeitnahe Initiierung der Behandlung ist für den Therapieerfolg von entscheidender Bedeutung (Hagel et al. 2016). Im Zuge der Neudefinition der Sepsis durch die Arbeitsgruppe SEPSIS-3 im Jahr 2016 wurde daher basierend auf den Kardinalsymptomen einer Sepsis der "quick Sepsis Related Organ Failure Assessment (qSOFA) Score" vorgestellt (Singer et al. 2016) (Dweepetal.É. Dieser umfasst drei Kriterien: Atemfrequenz >22/min, veränderter Bewusstseinsstatus und systolischer Blutdruck ≤100mmHg (Singer et al. 2016). Der qSOFA Score soll die frühzeitige Diagnostik von Risiko-Patienten im ambulanten Bereich, auf Normalstationen und in Notfallaufnahmen erleichtern und die rechtszeitige Einleitung einer intensivmedizinischen Betreuung sicherstellen (Richter et al. 2018). Die Erfordernisse einer solchen Vorgehensweise werden durch Daten zur SepsisInzidenz sowie Sepsis-Mortalität gestützt. Im Jahr 2011 wurden in Deutschland 175.051 Patienten mit septischen Erkrankungen registriert. Lediglich 37,8% dieser Patienten erhielten eine intensivmedizinische Betreuung (Brunkhorst und Schmitz 2016a). Die Krankenhaussterblichkeitsrate variierte in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung: 10,5% bei Sepsis, 41,3% bei schwerer Sepsis und 60,5% bei septischem Schock (Brunkhorst und Schmitz 2016a).

#### **1.1.3** Pathophysiologie einer Sepsis

Die Ausweitung einer zunächst lokalen Entzündung auf den Gesamtorganismus hat erhebliche funktionelle Konsequenzen. Bei einer systemischen Aktivierung des Endothels durch proinflammatorische Zytokine bewirken die Vasodilatatoren NO und PGI2 eine Weitstellung aller kleinen Gefäße des Körperkreislaufes (Uhle et al. 2016). Zudem tritt eine verminderte Ansprechbarkeit der Endothelzellen auf Vasokonstriktoren, wie Angiotensin II und Noradrenalin, auf (Burgdorff et al. 2018). Die gestörte Mikrozirkulation geht mit einer Abnahme des Herzzeitvolumens einher, die zunächst durch eine Steigerung der Herzfrequenz gegenreguliert wird (Weyland und Jelschen 2016). Verschärft wird die Situation durch aktivierte Immunzellen, die in Folge der generalisierten endothelialen Dysfunktion auch in ursprünglich gesundes Gewebe einwandern (Uhle et al. 2016). Die durch die Leukozyten ausgeschütteten antimikrobiellen Substanzen, u.a. ROS und Peroxynitrit, werden verdächtigt durch die Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion die Sauerstoffutilisation betroffener Zellen zu stören und somit die Apoptose- und Nekroserate der Zellen zu steigern (Müller-Werdan et al. 2016). Die resultierende Endothelschädigung geht mit einem Kapillarleck einher, gekennzeichnet durch eine drastische Erhöhung der endothelialen Permeabilität (Uhle et al. 2016). Intravaskuläre Flüssigkeit tritt in das umliegende Gewebe aus, sodass das Herzzeitvolumen bis hin zum Kreislaufversagen weiter abnimmt (Weyland und Jelschen 2016). Durch diesen sog. septischen Schock wird die Unterversorgung der Gewebe, die ihren Ursprung in den Mikrozirkulations- und Verteilungsstörungen hat, weiter verstärkt. Letztendlich tritt eine Dysfunktion eines oder mehrerer Organe ein (Janssens 2016). Problematisch ist in diesem Zusammenhang, dass die intensivmedizinischen Therapiemöglichkeiten (Volumensubstitution und Gabe von Vasokonstriktoren) aufgrund der pathophysiologischen Mechanismen nur unzureichende Wirkung entfalten (Burgdorff et al. 2018). Ferner besteht eine Fehlregulation des Gerinnungssystems, die mit der Bildung von Mikrogerinnseln einhergeht und im schlimmsten Fall zu einer sog. Sepsis-assoziierten Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) führen kann (Dempfle 2016). Diese äußert sich durch mikrovaskuläre Thrombosen, die die Organdysfunktion weiter aggravieren (Janssens 2016).

In einem fortgeschrittenen Stadium der Sepsis tritt das sog. Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome (CARS) auf, das Prozesse einer anti-inflammatorischen Gegenregulation umfasst. Hierzu zählen die Ausschüttung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-4, IL-10 oder Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ), sowie von IL-1 Rezeptor Antagonist (IL1RAs) und löslichem TNF-Rezeptor-1 (TNFR1). Die Monozyten polarisieren sich vermehrt zum antiinflammatorischen M2-Typ. Die Verschiebung der Immunreaktion von pro- zu antiinflammatorisch kann so stark ausgeprägt sein, dass eine Anergie der Immunzellen eintritt. Zudem initiiert das zirkulierende TNF- $\alpha$  die Apoptose von Immunzellen. Hierdurch wird der Organismus anfällig für nosokomiale und opportunistische Infektionen(Uhle et al. 2016). Die Folge ist eine Eskalierung der Erkrankung, die in einem Multiorganversagen endet (Richter et al. 2018).

#### 1.2 Genexpression und -regulation

Genexpression bedeutet das Ablesen der DNA und die Verarbeitung ihrer Information zu Genprodukten, wie RNA oder Proteinen. Der erste Schritt der Genexpression ist die im Zellkern ablaufende Transkription. Hierzu bindet die RNA-Polymerase mit Hilfe von regulären Transkriptionsfaktoren an spezielle DNA-Sequenzen, Promotoren genannt, und kopiert einen Abschnitt der DNA in RNA. Es werden sowohl Protein-kodierende RNAs (messenger RNAs, kurz mRNAs) als auch non-coding RNAs (ncRNAs) gebildet (Müller-Esterl 2018c). Der zweite Schritt der Genexpression ist die im Zytosol oder am rauen endoplasmatischen Retikulum ablaufende Translation der mRNA. Hierbei wird die Basenabfolge der mRNAs in eine Abfolge von Aminosäuren übersetzt, die letztendlich ein Protein bilden (Müller-Esterl 2018d).

Die Genexpression wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert. Von Bedeutung für die Menge an gebildeter mRNA ist die sogenannte transkriptionelle Regulation, die u.a. durch spezielle Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Transkriptionsfaktoren interagieren mit regulatorischen DNA-Abschnitten und beeinflussen hierbei die Transkriptionsrate eines Gens. Doch nicht nur die Syntheserate, sondern auch die Stabilität und die Abbaurate wirken sich auf die Menge der für die Translation zur Verfügung stehenden mRNAs aus. Im Rahmen dieser post-transkriptionellen Regulation spielen ncRNAs, wie die microRNAs (miRNAs), eine entscheidende Rolle (Djebali et al. 2012; Müller-Esterl 2018c).

#### 1.3 miRNAs

miRNAs wurden erstmals 1993 in *Caenorhabditis elegans* entdeckt, doch blieb ihre Funktion bis zum Jahr 2001 wenig beachtet (Lau et al. 2001). Seitdem wurden mehrere Hundert miRNAs in verschiedenen Spezies identifiziert (beim Menschen gegenwärtig 2654 reife miRNAs (miRBase Stand: Release 22.1, Oktober 2018)) (Kozomara et al. 2019) und ihre Funktion als posttranskriptionelle Regulatoren in der Genexpression immer weiter beleuchtet (Bührke et al. 2017). miRNAs sind einzelsträngige RNAs und haben typischerweise eine Länge von ca. 22 Nukleotiden (Bührke et al. 2017). Ihre Gene liegen verstreut im gesamten Genom. Einem Großteil konnte eigene Promotoren zugeordnet werden, die das Ablesen und Kopieren der miRNA-Gene initiieren (MacFarlane and Murphy 2010). Etwa ein Viertel der humanen miRNA-Gene befindet sich in Intron-Bereichen (nicht-kodierende Sequenz der DNA) von Proteinkodierenden Genen und unterliegt der Kontrolle derer Promotoren (Müller-Esterl 2018c). Manche miRNA-Gene sind innerhalb der DNA in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert; diese Ansammlungen von miRNA-Genen werden Cluster genannt und unterliegen der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors (Lin und Gregory 2015). miRNAs eines Clusters gehören oftmals einer miRNA-Familie an, die sich durch die Ähnlichkeit der Nukleotid-Sequenzen der einzelnen Familien-Mitglieder auszeichnet. Inwiefern die Cluster auch miRNAs mit funktionellen Übereinstimmungen bündeln, ist bisher nicht abschließend geklärt (Zhang et al. 2015).

Die miRNA-Synthese ist im Überblick in Abbildung 1 dargestellt. Die Transkription der miRNA-Gene im Zellkern erfolgt mehrheitlich durch die RNA-Polymerase II unter Bildung einer primären miRNA (pri-miRNA), die ca. 80 Nukleotide lang und haarnadelförmig ist. Im Rahmen einer posttranskriptionellen Modifikation der pri-miRNA wird u.a. an das 5'-Ende ein 7-Methylguanylat und an das 3'-Ende eine Polyadenylat-Kette synthetisiert (Knippers 2006). Die so modifizierte pri-miRNA wird durch den nuklearen Enzymkomplex bestehend aus dem RNA-bindenden Protein Pasha und der RNase III Drosha zur Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) gekürzt (Länge ca. 70 Nukleotide) und anschließend aktiv mittels Exportin-5 aus dem Zellkern transportiert (van Rooij und Olson 2012). Im Zytoplasma wird durch den Enzymkomplex Dicer die Haarnadelstruktur entfernt. Es entsteht ein ca. 22 Nukleotide langer und doppelsträngiger miRNA-Duplex (Lin und Gregory 2015). Durch Interaktion mit dem RNA-induced Silencing Complex (RISC) wird dieser miRNA-Duplex entwunden unter Bildung von zwei komplementären einzelsträngigen reifen miRNAs. Durch Interaktion einer reifen miRNA mit dem RISC wird der miRNA-containing RISC (miRISC) ausgebildet (Yang et al. 2011).

Die Funktion des miRISC besteht in der Beeinflussung der Translation der sog. Ziel-mRNA (Carroll et al. 2014). Dabei bestimmen die Bindungsstelle der miRNA auf der Ziel-mRNA und das Maß der Komplementarität dieser Basenpaarung die Wirkung auf die mRNA-Expression. Eine hohe Komplementarität der Basenpaarung innerhalb der sog. Seed-Region der miRNA mit dem 3'-Ende der Ziel-mRNA induziert eine verminderte Translation sowie ein Decapping und eine Deadenylierung dieser mRNA (Zhang et al. 2015). Interaktionen zwischen miRNA und einem 5'-

6

Ende oder kodierenden Sequenzen einer Ziel-mRNA führen zu einem Gen-Silencing (Huntzinger und Izaurralde 2011; Ipsaro und Joshua-Tor 2015), wohingegen Interaktionen zwischen miRNA und einer mRNA-Promotorregion eine Transkription induzieren (Dharap et al. 2013).



Abbildung 1) miRNA-Synthese im Überblick.

Eine miRNA kann demzufolge mehrere Ziel-Sequenzen innerhalb einer mRNA besitzen. Es wird vermutet, dass ca. 60% der humanen Protein-kodierenden Gene von einer miRNA-basierten Regulation betroffen sind (Friedman et al. 2009). Hierbei stellt sich die miRNA-basierte post-transkriptionelle Regulation als ausgesprochen komplex dar: 1) Eine mRNA kann das Ziel verschiedener miRNAs sein. 2) Eine miRNA kann verschiedene mRNAs erkennen und beeinflussen (Friedman et al. 2009; Liu et al. 2014). miRNAs werden zell- und gewebespezifisch exprimiert (MacFarlane and Murphy 2010). Zudem sind Assoziationen zwischen veränderten miRNA-Expressionsraten und verschiedenen pathologischen Zuständen, u.a. onkologischen und kardiovaskulären Erkrankung sowie entzündlichen Prozessen, beschrieben (Lin und Gregory 2015; Thum und Condorelli 2015; Marques-Rocha et al. 2015).

### 1.3.1 miRNA-Nomenklatur

Die Fachbezeichnung von miRNAs soll nachfolgend am Beispiel der miRNA hsa-miR-30e-5p erläutert werden (Abbildung 2). Der Terminus "hsa" gibt Aufschluss über die Spezies, in der die entsprechende miRNA exprimiert wird. Eine humane miRNA wird mit "hsa", kurz für *Homo sapiens*, eine murine miRNA hingegen mit "mmu" für *Mus musculus* gekennzeichnet. Der Terminus "miR" zeigt das Vorliegen einer reifen miRNA an (Desvignes et al. 2015). Alle

existierenden miRNAs werden entsprechend der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung nummeriert; im vorliegenden Beispiel entspricht dies der Zahl "30". Die hsa-miR-30e-5p ist zudem Teil einer miRNA-Familie bestehend aus sechs Mitgliedern (miRBAse Release 22.1: Oktober 2018), die mit den Buchstaben "a" bis "e" gekennzeichnet sind (Desvignes et al. 2015). Im Prozess der miRNA-Reifung gehen zwei zueinander komplementäre miRNAs aus einer doppelsträngigen pre-miRNA hervor; diese werden "5p" bzw. "3p" benannt. Die Termini "5p" und "3p" stehen hierbei für das 5'- bzw. 3'-Ende der Vorläufer miRNA-Haarnadel (Griffiths-Jones et al. 2011; Yang et al. 2011).



Abbildung 2) miRNA-Nomenklatur am Beispiel hsa-miR-30e-3p.

## 1.3.2 miRNA-Analyse

Der quantitative Nachweis von miRNAs ist aufgrund der geringen Größe der reifen miRNAs, dem hohen Maß an Homologien zwischen Mitgliedern von miRNA-Familien sowie der teilweise geringen Abundanz technisch anspruchsvoll (Mestdagh et al. 2014). Basierend auf der physiologischen Bedeutung der miRNAs existiert trotzdem eine wachsende Anzahl von Nachweismethoden. Drei gängige Technologien zur Detektion von miRNAs sind die Sequenzierung, die Hybridisierung und die quantitative Polymerase-Kettenreaktion, PCR abgekürzt (Mestdagh et al. 2014). Hierbei werden die Sequenzierungs- und Hybridisierungs-Techniken vorrangig zum miRNA-Screening eingesetzt. Zur Validierung von identifizierten miRNA-Expressionsunterschieden empfiehlt die microRNA Quality Control (miRQC)-Studie von Mestdagh et al. (2014) eine alternative Methode zu verwenden. Hierfür bietet sich die quantitative PCR, auch Real-Time-PCR genannt, an.

Die Sequenzierung bietet die Möglichkeit, alle in einer Probe vorliegenden miRNAs zu detektieren, unabhängig davon, ob diese bereits in einer miRNA-Datenbank hinterlegt sind. Die Sensitivität der Sequenzierung gilt als hoch (Huang 2011). Die Sequenzierung wird daher als eine zuverlässige und umfassende Möglichkeit für ein miRNA-Screening angesehen (Fishman 2010). Das Illumina® HighScan<sup>™</sup>SQ System gehört zu den modernen Sequenzierungs-Methoden, die durch parallele Analyse von Millionen von DNA-Fragmenten innerhalb eines einzigen Sequenzierungslaufes die ursprüngliche Sanger-Methode abgelöst hat (Luthra et al. 2015). Das Prinzip dieses Systems basiert grob auf drei Schritten: 1) Herstellung einer DNA-Bibliothek durch

Zerkleinerung der Proben-DNA in DNA-Fragmente mit einer Länge von weniger als 100 Basenpaaren sowie die anschließende Ligation von Adaptern, 2) klonale Amplifizierung basierend auf einer Brücken-PCR, 3) Sequenzierung mittels der Sequencing-by-Synthesis (SBS) Methode von Illumina<sup>®</sup> (Fishman 2010; Huang 2011). Abschließend werden die entstandenen DNA-Fragmente, Reads genannt, mittels einer Computer-Software über die Komplementarität der Basenpaare ihrem ursprünglichen DNA-Strang zugeordnet (Luthra et al. 2015). Dieser Abgleich wird auch als Alignment bezeichnet und benötigt eine Referenzsequenz, z.B. das Genom. Aufgrund der kurzen Fragmente und der langen Referenzsequenz gibt es häufig mehrere Übereinstimmungen, wodurch fehlerhafte Zuordnungen entstehen können (Ferdous und Ullah 2017). Zudem können aufgrund der genetischen Variabilität nicht nur komplette Übereinstimmungen der Basenpaare angenommen werden. Deshalb ist eine Normalisierung der Ergebnisse im Anschluss der Untersuchung unbedingt nötig (Timpson et al. 2017).

Zu den Hybridisierungs-Methoden zählen die Microarray- und die NanoString-Technologie (Mestdagh et al. 2014). Die Microarray-Technologie beruht auf bekannten Gen-Sequenzen aus Fluoreszenzfarbstoff-markierten Nukleotiden, die auf einer definierten Position eines Objektträgers immobilisiert vorliegen. Diese dienen als Sonden, die nach Zugabe von komplementärer DNA (cDNA) mit den komplementären Ziel-Sequenzen hybridisieren (Schober 2002; Baker 2010). Die NanoString-Technologie basiert auf einem farbkodierten Sonden-Paar und der digitalen Detektion dieses Farbcodes. Durch die Komplexität der Farbcodes können in einem Ansatz eine Vielfalt an mehreren hundert bekannten miRNAs identifiziert werden (M'Boutchou und van Kempen 2016). Eine Umschreibung in cDNA oder eine Amplifizierung, wie bei der Microarray-Technologie, ist nicht erforderlich (M'Boutchou und van Kempen 2016). Zur Probenvorbereitung werden Oligonukleotid-Anhänge an die miRNAs ligiert. Dem folgt eine Hybridisierungs-Reaktion, bei der sich die farbkodierten Sonden-Paare an die spezifischen miRNAs anlagern. Anschließend werden die Proben im nCounter FLEX Analyse-System basierend auf einer Magnet-Kügelchen-Technologie von überschüssigen Sonden gereinigt und die farbcodierten Strichcodes mittels Kamera und Mikroskop ausgezählt (M'Boutchou und van Kempen 2016). Dabei werden auch Unterschiede von miRNAs mit einer niedrigen Abundanz mit einer hohen Sensitivität und Spezifität detektiert (Mestdagh et al. 2014). Einschränkend ist festzuhalten, dass mit Hilfe von Hybridisierungs-Technologien aufgrund der Verwendung spezifischer Sonden ausschließlich bekannte, d.h. in einer miRNA-Datenbank hinterlegte miRNAs, analysiert werden können (Luthra et al. 2015). Die Arrays der Hybridisierungs-Technologien sind zudem beschränkt in der Zahl der pro Durchlauf gleichzeitig detektierbaren miRNAs (z.B. nCounter<sup>®</sup> Human v3 miRNA Expression Assay: 800 miRNAs).

9

Die quantitative PCR basiert auf einer Polymerase-Kettenreaktion, bei der die Amplifizierung der DNA kontinuierlich im Laufe des Synthesevorganges detektiert wird. Dies unterscheidet sie von der klassischen PCR, bei der die entstandene DNA-Menge erst nach Abschluss der Reaktion vermessen werden kann (Thornton und Basu 2015). Die Auswertung der PCR-Daten benötigt eine Referenz-miRNA, deren Expression durch die experimentellen Bedingungen nicht beeinflusst sein darf (Marabita et al. 2016). Für die Untersuchung der miRNA-Expression im proinflammatorischen Milieu konnte eine solche miRNA bisher jedoch nicht zuverlässig identifiziert werden (Benz et al. 2016; Correia et al. 2017; Correia et al. 2017; Correia et al. 2017). Als Alternative bietet sich die Droplet Digital<sup>™</sup> PCR (ddPCR) an, die die absolute Quantifizierung von miRNAs ermöglicht. Die ddPCR beruht auf einer Tröpfchen-basierten Mikrofluidik-Technologie. Die cDNA-Probe wird zufällig auf Tröpfchen verteilt und anschließend mittels PCR innerhalb der Tröpfchen amplifiziert. Tröpfchen mit doppelsträngiger DNA (= positive Tröpfchen) werden mit Hilfe eines Farbstoffes detektiert und können von den unbeladenen (= negativen) Tröpfchen unterschieden werden (Floren et al. 2015). Basierend auf dem Poisson-Algorithmus kann anhand der Anzahl von positiven und negativen Tröpfchen die Start-Konzentration der ProbencDNA in der Einheit Kopien/µl errechnet werden (Gürtler und Gerdes 2014). Eine Normalisierung ist aufgrund der durchgeführten absoluten Quantifizierung nicht erforderlich (Campomenosi et al. 2016).

#### 1.3.3 In silico-Analyse

Eine *in silico*-Analyse basiert auf Computersimulationen unter Verwendung spezieller Programme oder Algorithmen (Murray et al. 2007). Es gibt verschiedene elektronische Datenbanken, die die wachsende Menge an Informationen bezüglich miRNAs und ihren Zielgenen sammeln. Hierzu zählen unter anderem miRBase (<u>http://www.mirbase.org/</u>), miRWalk2.0 (<u>http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/</u>) und das Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool (GOrilla) (<u>http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/</u>).

miRBase ist die primäre Quelle von miRNA Sequenzen und enthält gegenwärtig Informationen zu 48860 Einträge zu reifen miRNAs verschiedener Spezies (miRBase Stand: Release 22.1, Oktober 2018). Die Datenbank sammelt kontinuierlich neu bekanntwerdende Eigenschaften von miRNAs und dient anderen Datenbanken, wie z.B. miRWalk2.0, als Quelle (Kozomara et al. 2019).

miRWalk2.0 sammelt Informationen über die Zielgene von miRNAs verschiedener Spezies und gibt Aufschluss über miRNA-spezifische Eigenschaften wie Basensequenz, miRNA-Familie, Genloki und Transkript-Varianten (Lee et al. 2015; Parveen et al. 2016). Die Datenbank verfügt

über zwei Module. Das Validated Target-Modul liefert Informationen über experimentell nachgewiesene Interaktionen von miRNAs und mRNAs, die in den Datenbanken miRBase, National Center for Biotechnology Information (NCBI), Molecular Biology Laboratory (EMBL), HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), Mouse Genome Informatics (MGI), Rfam und WormBase hinterlegt sind (Lee et al. 2015). Das Predicted Target-Modul ermittelt mutmaßliche miRNA-Ziele basierend auf einem eigenen Algorithmus, wonach ein Abgleich der Ergebnisse mit bis zu zwölf anderen Datenbanken (Diana-microT4, Diana-micro-CDS, miRBridge, miRDB, miRMap, miRNAMap, Pictar2, RNA22, miRanda, RNAhybrid, PITA, TargetScan) erfolgt (Dweep et al. 2014; Parveen et al. 2016). Durch das Zusammenführen verschiedener Programme bietet miRWalk2.0 eine Plattform zur umfassenden Identifizierung von miRNA-Zielen (Parveen et al. 2016).

Mit Hilfe von GOrilla werden Gene Ontology (GO) Begriffe, die den einzelnen Zielgenen zugeordnet wurden, identifiziert und visualisiert (Eden et al. 2009). GO verfolgt das Ziel, vorhandenes Wissen zu Genen einheitlich darzustellen und verwendet hierfür fest definierte Begriffe (Gaudet et al. 2011). Es werden dabei drei Hauptgebiete unterschieden: molekulare Funktionen, biologische Prozesse und zelluläre Kompartimente (Eden et al. 2009). Innerhalb dieser zeigt GOrilla mittels eines Baumdiagramms die Beziehungen zwischen den Begriffen auf. Alternativ zum Baumdiagramm werden die Begriffe zudem in einer Tabelle dargestellt (Harris et al. 2004; Eden et al. 2009). GOrilla verwendet zur Identifizierung von Häufungen den minimum Hypergeometric (mHG)-Test (Eden et al. 2009).

#### 1.4 miRNAs und Sepsis

miRNAs werden im Zusammenhang mit Sepsis mit wachsendem Interesse studiert und konnten bereits mit pro- und anti-inflammatorischen Prozessen des Immunsystems assoziiert werden. Bereits im Jahr 2010 wurden miRNA-Expressionsunterschiede in B- und T-Zellen nachgewiesen (Wittmann et al. 2011). Seitdem sind weitere zelluläre Akteure und Signalkaskaden des Immunsystems in den Fokus gerückt. Dominierend sind bisher Untersuchungen bezüglich der Beeinflussung der TLR-4-Signaltransduktionskaskade in Monozyten bzw. Makrophagen (Wang et al. 2017).

Essandoh et al. verglichen die miRNA-Expressionsprofile von Monozyten/Makrophagen in Abhängigkeit von der Polarisierung der Immunzellen zum M1- bzw. M2-Typ (Essandoh et al. 2016). Demzufolge weisen M1-Zellen erhöhte Expressionsraten von miR-9, miR-125b, miR-127 und miR-155 auf, wohingegen M2-Zellen u.a. miR-125a-5p, miR-132, miR-146a und miR-223 vermehrt exprimieren (Essandoh et al. 2016). Auch Wang et al. wiesen nach LPS-Stimulation

11

muriner Monozyten/Makrophagen (Zelllinie RAW264.7) eine erhöhte miR-155-Expression nach, die in direktem Zusammenhang mit dem immunologisch bedeutsamen Transkriptionsfaktor NFκB gestellt wurde (Wang et al. 2013a). Moon et al. beobachteten eine gesteigerte Expression von miR-15a und miR-16 nach Exposition von Makrophagen mit LPS, die mit einer verminderten Phagozytoserate, einer Zunahme des oxidativen Bursts sowie einer erhöhten TLR-4-Synthese korrelierte (Moon et al. 2014). Im Folgejahr analysierten Wang et al. die Expression von TLR-4 und der IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK)-1 in RAW264.7-Zellen unter dem Einfluss von miR-15a/miR-16-Mimics und der gleichzeitigen Exposition mit LPS und wiesen, anders als Moon et al., eine verminderte Synthese von TLR-4 und IRAK-1 nach (Wang et al. 2015)

Auch das Endothel ist zunehmend in den Blickpunkt von Sepsis- und miRNA-assoziierten Studien gerückt. Dabei stand bisher überwiegend die Analyse einzelner miRNAs im Vordergrund. So zeigten Wu et al. bei LPS-stimulierten vaskulären Endothelzellen (VECs) eine verminderte Expression von miR-23b und konnten mit Hilfe von miR-23b-Mimics eine Expressionshemmung von NFkB und weiteren Entzündungs-assoziierten Genen herbeiführen (Wu et al. 2015). In humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVECs) wiesen Wu et al. nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  oder LPS eine erhöhte miR-155-Expression nach, wobei diese miRNA über negative Regulierung von p65, einer Untereinheit von NFκB, einen hemmenden Einfluss auf die Synthese von Adhäsionsfaktoren (ICAM-1, VCAM-1) und endothelialer NO-Synthase (eNOS) hatte (Wu et al. 2014). Die miRNAs miR-126 und miR-147b wurden mit Veränderungen der endothelialen Permeabilität in Verbindung gebracht (Fan et al. 2014; Chatterjee et al. 2014). In HUVECs wurde durch Sun et al. miR-181b als regulierende miRNA von Importin-alpha-3 identifiziert (Sun et al. 2012). Die hieraus resultierende Hemmung der NFκB-Untereinheiten p105 und p65 wirkte sich u.a. negativ auf die Expression von Adhäsionsproteinen (VCAM-1, E-Selektin), Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren nach TNF- $\alpha$ -Stimulation aus (Sun et al. 2012). Ein umfassendes Screening der zellulären miRNA-Expression führten Pfeiffer et al. mit einem 1891 miRNAs umfassenden Array an HUVECs und primären humanen pulmonalen mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMECs) durch, die mit dem Kulturüberstand von LPS-stimulierten THP-1 Monozyten behandelt worden waren (Pfeiffer et al. 2017). Jeweils 18 miRNAs wurden als verändert exprimiert identifiziert, u.a. miR-146a, miR-146b und miR-155 (Pfeiffer et al. 2017).

*Ex vivo- und in vivo*-Untersuchungen an septischen Tieren unterstreichen die Bedeutung der miRNAs miR-126a-3p und miR-155. In einer Microarray-Studie basierend auf Aorten septischer C57BL/6-Mäuse, zeigten Chu et al., dass eine gesteigerte Expression von miR-126a-3p mit einer verminderten Ausprägung der endothelialen Dysfunktion einhergeht. miR-126a-3p wurde zuvor in Studien im Zusammenhang mit vaskulären Erkrankungen identifiziert und konnte bei einem

12

Experiment mit Endothelzellen septischer Mäuse mit einer 50% verminderten Expression detektiert werden (Schober et al. 2014). Mit Hilfe von miR-155-defizienten Mäusen wurde zudem die Funktion von miR-155 für eine effiziente Immunantwort untermauert (Wang et al. 2013a).

miRNAs sind nicht nur intrazellulär, sondern auch außerhalb der Zelle in verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie Blut, Schweiß, Urin oder Muttermilch, nachweisbar (Ma et al. 2013). Diese zirkulierenden miRNAs, die sowohl passiv über Apoptose-Körperchen als auch aktiv durch Sekretion von Mikrovesikeln in den Extrazellularraum gelangen, werden als potenzielle Sepsis-Biomarker diskutiert (Roderburg et al. 2013). Zu den bislang im Blut bzw. Serum septischer Patienten als verändert exprimiert identifizierten miRNAs zählen u.a. let-7b, miR-15b, miR-16, miR-210, miR-324-3p, miR-486-5p (Huang et al. 2014), miR-146a (Wang et al. 2013b) sowie miR-181b (Sun et al. 2012).

### 2 Zielstellung

Septische Erkrankungen sind durch eine hohe und tendenziell steigende Inzidenz gekennzeichnet (Werdan et al. 2016). Zudem sind die gegenwärtigen therapeutischen Möglichkeiten eingeschränkt, was sich in der erheblichen Mortalität von Sepsis-Patienten widerspiegelt (Richter et al. 2018). Hintergrund ist das zum Teil eingeschränkte Verständnis der mechanistischen Abläufe dieser Erkrankung. Im Sinne einer Verbesserung der Therapieoptionen bei einer Sepsis besteht daher Bedarf an grundlagenwissenschaftlichen Untersuchungen zur Aufklärung der im Rahmen einer Sepsis auf molekularer Ebene ablaufenden Prozesse.

In der Literatur mehren sich die Hinweise auf eine veränderte Expression von miRNAs im Zusammenhang mit septischen Erkrankungen. Differenziell exprimierte miRNAs werden hierbei zum einen als potenzielle neue Sepsis-Biomarker diskutiert (Ho et al. 2016). Zum anderen bestehen Überlegungen eines miRNA-basierten therapeutischen Ansatzes, der auf der gezielten Manipulation der Expression spezifischer miRNAs beruht (Zhang et al. 2017). Voraussetzung hierfür ist ein profundes Wissen der im Rahmen einer Sepsis zell- und gewebespezifisch verändert exprimierten miRNAs.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher in Aorten septischer Mäuse sowie in pro-inflammatorisch exponierten Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen mittels eines umfassenden zweifachen Screenings in Kombination mit einer ddPCR-basierten Validierung differenziell exprimierte miRNAs zu identifizieren. Ferner galt es mittels *in silico*-Analyse die Sepsisassoziierten Zielgene validierter miRNAs zu ermitteln und auf Basis der gewonnenen Daten eine Übersicht der putativen Wirkmechanismen der miRNAs zu erstellen.

- 3 Material und Methoden
- 3.1 Material
- 3.1.1 Geräte

| Bezeichnung  | Hersteller                           |
|--|--------------------------------------|
| Accu-jet <sup>®</sup> pro Pipettierhelfer                    | BRAND (Wertheim)                     |
| Eismaschine UBE 50-35  | ZIEGRA (Isernhagen)                  |
| Gefrierschrank   | Liebherr (Rostock)                   |
| Heraeus™ Fresco™ 17 Microzentrifuge                          | Thermo Fisher Scientific (Dreieich)  |
| Heraeus <sup>™</sup> Function Line Brutschrank               | Thermo Fisher Scientific (Dreieich)  |
| Inverses Mikroskop, Wilovert Standard HF 20                  | Hund (Wetzlar)                       |
| Mastercycler <sup>®</sup> nexus                              | Eppendorf (Hamburg)                  |
| Mehrkanalpipetten, Typ Acura <sup>®</sup>                    | Socorex (Lausanne)                   |
| Mikrozentrifuge, 6.000 U/Min.                                | A. Hartenstein (Würzburg)            |
| NanoVue <sup>™</sup> Spektrophotometer                       | GE Healthcare Europe (Freiburg)      |
| nCounter <sup>®</sup> FLEX Analysis System                   | NanoString Technologies (Hamburg)    |
| Pipet-Lite Multi Pipette L8-50XLS+, 5-50µl                   | Rainin (Gießen)                      |
| Plate Holder   | Bio-Rad (München)                    |
| PX1 <sup>™</sup> PCR Plate Sealer                            | Bio-Rad (München)                    |
| QX200 <sup>™</sup> Droplet Generator                         | Bio-Rad (München)                    |
| QX200™Droplet Reader   | Bio-Rad (München)                    |
| Reference <sup>®</sup> Pipetten, (2,5;10;100;200;1000 je μl) | Eppendorf (Hamburg)                  |
| Sicherheitsschrank Typ 90                                    | Düperthal (Karlstein)                |
| Sicherheitswerkbank, Klasse II, HERAsafe™, KS-Serie          | Thermo Fisher Scientific (Dreieich)  |
| Sprout Minizentrifuge  | Biozym (Hessisch Oldendorf)          |
| T100™ Thermozykler   | Bio-Rad (München)                    |
| UNO-Thermoblock  | Biometra (Göttingen)                 |
| Vortex-Genie <sup>®</sup> 2                                  | Scientific Industries (Cambridge,UK) |

# 3.1.1 Geräte (Fortsetzung)

| Bezeichnung                    | Hersteller             |
|--------------------------------|------------------------|
| Waldner Laborabzug MC 6        | Waldner Lab (Wangen)   |
| Zählkammer (Neubauer improved) | Heinz Herenz (Hamburg) |
| Zentrifuge 5430                | Eppendorf (Hamburg)    |

## 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung   | Hersteller                            |
|---|---------------------------------------|
| Barrier Pipette Tips 200µl; 1000µl                    | Sorenson BioScience (Grays Essex, UK) |
| Biosphere <sup>®</sup> Filter Tips 2,5μl; 20μl; 100μl | Sarstedt (Nümbrecht)                  |
| CELLSTAR <sup>®</sup> Röhrchen, 15ml                  | Greiner Bio-One (Frickenhausen)       |
| CELLSTAR <sup>®</sup> Serologische Pipetten, 1- 50ml  | Greiner Bio-One (Frickenhausen)       |
| CELLSTAR <sup>®</sup> Zellkultur Flaschen T25; T75    | Greiner Bio-One (Frickenhausen)       |
| ddPCR <sup>™</sup> 96-Well PCR Plates                 | Bio-Rad (München)                     |
| DG8™ Cartridge Holder                                 | Bio-Rad (München)                     |
| DG8™ Cartridges                                       | Bio-Rad (München)                     |
| DG8™ Gaskets  | Bio-Rad (München)                     |
| DNA LowBind Reagiergefäße 1,5ml                       | Sarstedt (Nümbrecht)                  |
| Handschuhe Sempercare <sup>®</sup> premium            | Sempermed (Gevelsberg)                |
| Handschuhe Vasco <sup>®</sup> Nitril light            | B.Braun (Melsungen)                   |
| Kryoboxen PP, 45 - 50 mm                              | A.Hartenstein (Würzburg)              |
| Kryo-Röhrchen   | Greiner Bio-One (Frickenhausen)       |
| Laborflasche PET steril, 500ml                        | Bürkle (Rheinauen)                    |
| Nunc™ 50 ml-Polypropylen-Zentrifugenröhrchen          | Thermo Fisher Scientific (Dreieich)   |
| PCR Plate Heat Seal, Foil, pierceable                 | Bio-Rad (München)                     |
| Permanent Marker Pen Fine                             | Faber-Castell (Geroldsgrün)           |

| Bezeichnung  | Hersteller                      |
|--|---------------------------------|
| ReliaPrep™ Syringe Filter Single Use Non-Pryogenic | Ahlstrom-Munksjö (Osnabrück)    |
| SafeSeal Reagiergefäße 0,5ml; 1,5ml                | Sarstedt (Nümbrecht)            |
| Zellschaber, 28cm                                  | Greiner Bio-One (Frickenhausen) |

# 3.1.2 Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung)

## 3.1.3 Chemikalien & Lösungen

| Bezeichnung   | Hersteller                          |
|---|-------------------------------------|
| Basales mikrovaskuläres Endothelzellen-             | Provito AG (Berlin)                 |
| Proliferationsmedium                                |                                     |
| Blasticidin S HCL                                   | Thermo Fisher Scientific (Dreieich) |
| Chloroform  | Sigma-Aldrich (Taufkirchen)         |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                             | Sigma-Aldrich (Taufkirchen)         |
| Ethanol, Laboratory Reagent 96%                     | Sigma-Aldrich (Taufkirchen)         |
| Fetales Kälberserum (FKS)                           | Provitro AG (Berlin)                |
| Glukose-Lösung, ≥99.5% (GC)                         | Provitro AG(Berlin)                 |
| HBSS-Pulver (Hank's Balanced Salt Solution)         | Sigma-Aldrich (Taufkirchen)         |
| HEPES, ≥99.5% (Titration)                           | Sigma-Aldrich (Taufkirchen)         |
| Isopropanol   | Sigma-Aldrich (Taufkirchen)         |
| Lipopolysaccharid, E. coli-Serotyp 0111: B4         | Sigma-Aldrich (Taufkirchen)         |
| Natriumchlorid-Lösung, 0,9% in Wasser, BioXtra      | Sigma-Aldrich (Taufkirchen)         |
| PBS-Lösung ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> | Biochrom (Berlin)                   |
| QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix                     | Bio-Rad (München)                   |
| QX200™ Droplet Generation Oil for EvaGreen          | Bio-Rad (München)                   |
| RPMI 1640 Kulturmedium, w/o: L-Glutamin,            | Pan-Biotech (Aidenbach)             |
| w/o: Phenolred, w:2,0g/I NAHCO3                     |                                     |
| TRIzol™ Reagent                                     | Thermo Fisher Scientific (Dreieich) |

# 3.1.3 Chemikalien & Lösungen (Fortsetzung)

| Bezeichnung                       | Hersteller                  |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Trypanblau-Lösung (0,4%)          | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Trypin-EDTA-Lösung, 1 ×, sterile  | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Wasser, Molecular Biology Reagent | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |

## 3.1.4 Zytokine & Wachstumsfaktoren

| Bezeichnung                                      | Hersteller           |
|--|----------------------|
| Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF)-1         | Provitro AG (Berlin) |
| Rekombinanter humaner epidermaler                |                      |
| Wachstumsfaktor (EGF)                            | Provitro AG (Berlin) |
| Rekombinanter humaner Fibroblasten-              | Drovitro AC (Dorlin) |
| Wachstumsfaktor (FGF)                            | Provitro AG (Benin)  |
| Rekombinanter humaner                            | Depretach (Hamburg)  |
| Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α)                 | Peprotech (Hamburg)  |
| Rekombinanter humaner vaskulärer endothelialer   | Provitro AC (Porlin) |
| Wachstumsfaktor (VEGF)                           | Provido AG (Bernin)  |
| Rekombinantes humanes Interferon-gamma (IFN-γ)   | PeproTech (Hamburg)  |
| Rekombinantes humanes Interleukin-1-beta (IL-1β) | PeproTech (Hamburg)  |

# 3.1.5 Verwendete Organismen/Zelllinien

| Bezeichnung   | Hersteller                        |
|---|-----------------------------------|
| Murine RAW264.7 Monozyten/Makrophagen                 |                                   |
| (ATCC-Nr.: TIB-71 <sup>™</sup> )                      | LGC Standards GmbH (Wesel)        |
| Humane Telomerase-Immortalized Microvascular          |                                   |
| Endothelial (TIME) (ATCC-Nr.: CRL-4025 <sup>™</sup> ) | LGC Standards GmbH (Wesel)        |
| C57BL/6J Mäuse (ATCC-Nr.: SCRC-1002 <sup>™</sup> )    | Tierhaltung, MLU Halle-Wittenberg |

# 3.1.6 Kits

| Bezeichnung  | Hersteller                        |
|--|-----------------------------------|
| nCounter <sup>®</sup> Master Kit                   | NanoString Technologies (Hamburg) |
| nCounter <sup>®</sup> miRNA Sample Preparation Kit | NanoString Technologies (Hamburg) |
| nCounter <sup>®</sup> miRNA Expression Assay Kit   | NanoString Technologies (Hamburg) |
| Universal cDNA Synthesis Kit II                    | Exiqon (Vedbæk, Dänemark)         |

# 3.1.7 Synthetische Oligonukleotide

| Bezeichnung                              | Hersteller                  |
|--|-----------------------------|
| LNA PCR primer set, UniRT,               |                             |
| spezifisch für humane und murine Proben: |                             |
| hsa-miR-9-5p, hsa-miR-15b-5p,            |                             |
| hsa-miR-16-5p, hsa-miR-21-5p,            |                             |
| hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-26b-5p,          |                             |
| hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p,          | Evizon () (odbolk Dänomork) |
| hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-30d-5p,          | Exigon (Vedbæk, Danemark)   |
| hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-93-5p,           |                             |
| hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-132-3p,         |                             |
| hsa-miR-144-3p, hsa-miR-146a-5p,         |                             |
| hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p,        |                             |
| hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-221-3p,         |                             |
| LNA PCR primer set, UniRT,               |                             |
| spezifisch für humane Proben:            | Exiqon (Vedbæk, Dänemark)   |
| hsa-miR-155-5p, hsa-miR-221-5p,          |                             |
| LNA PCR primer set, UniRT,               |                             |
| spezifisch für murine Proben:            | Exiqon (Vedbæk, Dänemark)   |
| mmu-miR-221-5p, mmu-miR-1198-5p          |                             |
| UniSp6, LNA control primer set, UniRT    | Exiqon (Vedbæk, Dänemark)   |

## 3.1.8 Zellkulturmedien

| Zelllinie                         | Medium-Rezeptur                                  |
|-----------------------------------|--|
| Endothelzellen TIME               | Basales mikrovaskuläres Endothelzellen-          |
|                                   | Proliferationsmedium + 5ng/ml rekombinanter      |
|                                   | humaner VEGF + 5ng/ml rekombinanter              |
|                                   | humaner EGF + 5ng/ml rekombinanter               |
|                                   | humaner FGF + 15ng/ml IGF-1 + 10mM L-Glutamin    |
|                                   | + 0,75U/ml Heparinsulfat + 1µg/ml Hydrocortison  |
|                                   | Hemisuccinat + 50µg/ml Ascorbinsäure             |
|                                   | + 5% v/v FKS + 12,5μg/ml Blasticidin S HCL       |
|                                   |  |
|                                   | 50ml RPMI 1640 Kulturmedium,                     |
| Monozyten/Makrophagen<br>RAW264.7 | w/o: L-Glutamin, w/o: Phenolred,                 |
|                                   | w: 2,0g/I NaHCO <sub>3</sub>                     |
|                                   | + 1,25g Glukose + 2,383g HEPES + 25ml 5% v/v FKS |

# 3.1.9 Software & Datenbanken

| Bezeichnung                       | Unternehmen   |
|-----------------------------------|---|
| Gene Ontology enRIchment anaLysis | Eran Eden, Doron Lipson,                                  |
| and visuaLizAtion tool (GOrilla)  | Sivan Yogev, Zohar Yakhini                                |
| GraphPad Prism Version 6          | GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA, USA)               |
| Microsoft Office 365 Version 1711 | Microsoft (München)                                       |
|                                   | Griffiths-Jones Lab (Faculty of Life Sciences, University |
| miRBase: the microRNA database    | of Manchester, UK)  |
|                                   | Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg,                    |
| miRWalk 2.0                       | Medizinische Fakultät Mannheim                            |
| nSolver <sup>™</sup> Version 3.0  | NanoString Technologies (Hamburg)                         |
| QuantaSoft™ Software              | Bio-Rad (München)   |

#### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Zellkultivierung und -stimulierung

Die Kultivierung der murinen Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 und der humanen Telomerase-Immortalized Microvascular Endothelial (TIME) Zellen sowie die Stimulierung der Zellen erfolgten durch Frau Anja Leimert, medizinisch-technische Angestellte des Forschungslabors für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Halle (Saale). Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen bei 37 °C und einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-haltigen, feuchten Atmosphäre entsprechend ATCC-Empfehlungen gezogen. Für die Kultivierung der RAW264.7 wurde mit HEPES (25 mmol/l) -gepuffertes RPMI 1640 Kulturmedium eingesetzt, welchem 4,5 g/l Glukose und 5 % v/v FKS zugesetzt wurde. Für die Kultivierung der TIME kam ein basales Proliferationsmedium für mikrovaskuläre Endothelzellen zum Einsatz, welches mit 5 ng/ml VEGF, 5 ng/ml EGF, 5 ng/ml FGF, 15 ng/ml IGF-1, 10 mM L-Glutamin, 0,75 U/ml Heparinsulfat, 1 µg/ml Hydrocortison-Hemisuccinat, 50 µg/ml Ascorbinsäure, 5 % v/v FKS und 12,5 µg/ml Blasticidin angereichert wurde.

Zur Stimulierung der RAW264.7 wurden die Zellen für 24 h mit 1  $\mu$ g/ml LPS (E. coli Serotyp 0111: B4) inkubiert. Zur Stimulierung der TIME erfolgte über einen Zeitraum von 24 h die simultane Behandlung der Zellen mit den Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) in Konzentrationen von jeweils 5 ng/ml.

#### 3.2.2 Gewinnung von murinen Aorten

Die Isolation von Aorten septischer C57BL/6-Mäuse erfolgte im Rahmen eines genehmigten Tierversuchsvorhabens (Genehmigungsnummer 42502-2-1300MLUG, Antragsteller: Prof. Dr. med. Ralf Anton Benndorf, verantwortlicher Leiter: apl. Prof. Dr. med. Christoph Raspé). Die C57BL/6-Mäuse wurden nach den Empfehlungen und Richtlinien des Komitees für Tierpflege und Tiernutzung des Landesverwaltungsamtes Sachsen-Anhalt unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten. Weiblichen Tieren im Alter von 8 bis 12 Wochen wurde intraperitoneal (i.p.) eine LPS-Lösung vom E. coli Serotyp 0111: B4 (1 mg/kg Körpergewicht gelöst in 10 ml/kg Körpergewicht 0,9 % NaCl) appliziert. 12 h nach LPS-Gabe wurden die Tiere unter Isofluran-Narkose getötet. Die vollständige Aorta wurde entnommen und bei -80 °C eingelagert.

#### 3.2.3 RNA-Isolierung

Die Gewinnung von Gesamt-RNA erfolgt mittels TRIzol<sup>™</sup> Reagenz entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Isolierte murine Gesamt-Aorten bzw. 2 x 10<sup>6</sup> Zellen der Zelllinien RAW264.7 und TIME wurden für 5 min bei Raumtemperatur mit 1 ml TRIzol<sup>™</sup> Reagenz inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde die Probe 15 s kräftig geschüttelt und bei Raumtemperatur 3 min inkubiert. Dem folgte eine Zentrifugation bei 4 °C mit 12000 x g für 15 min, wonach sich eine Auftrennung in drei Phasen erkennen ließ. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation bei 4 °C mit 12000 x g für 10 min, wonach die RNA ein Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes bildete. Der Überstand wurde mittels einer Pipette abgetragen. Zur Reinigung des RNA-Pellets wurde 1 ml 75 %iges Ethanol zugegeben, bei 4 °C mit 12000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde zweimal durchgeführt. Nach der Lufttrocknung des RNA-Pellets wurde die RNA in 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser gelöst.

#### 3.2.4 RNA-Konzentrationsmessung

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA erfolgte mit Hilfe des NanoVue Spektrophotometers. Ermittelt wurde die Absorption der Probe bei den Wellenlängen 230nm, 260 nm und 280 nm. Anhand des Absorptionsmaximums bei 260 nm wurde vom Gerät eine Quantifizierung der Nukleinsäuren vorgenommen. Zudem wurde durch Angabe der Verhältnisse 260 nm/230 nm und 260 nm/280 nm eine Einschätzung der Reinheit der isolierten RNA vorgenommen. Proben mit einem 260 nm/230 nm-Verhältnis zwischen 2,0 und 2,2 sowie einem 260 nm/280 nm-Verhältnis ≥2,0 wurden als rein angesehen.

### 3.2.5 miRNA-Screening

Zur Identifizierung verändert exprimierter miRNAs wurden die Proben mit Hilfe von zwei verschiedenen Screening-Methoden unabhängig voneinander untersucht: 1) Next Generation Sequencing (NGS) und 2) NanoString-Technologie.

Das NGS mit dem Illumina® HiScan<sup>™</sup>SQ System wurde von der Core-Unit DNA der Universität Leipzig unter der Leitung von PD Dr. Knut Krohn durchgeführt. Dafür wurden 500 ng Gesamt-RNA isoliert aus murinem aortalem Gewebe sowie unstimulierten bzw. stimulierten RAW264.7 und TIME zur Analyse eingeschickt. Als Referenzquellen für die Zuordnung der generierten Reads zu einer potenziellen miRNA dienten zum einen die Sequenzen bekannter reifer miRNAs und zum anderen die gesamte Genomsequenz (jeweils human oder murin). Zur Normalisierung wurden die beiden Software-Pakete LogGeometricMean (DESeq) und TMM (edgeR) genutzt, die beide auf dem negativen Binominalmodell basieren (Ferdous und Ullah 2017). Die Ergebnisse der beiden Software-Pakete DESeq und TMM wurde zu einem Mittelwert verrechnet und im Folgenden weiter als Ergebnis der NGS-Untersuchung verwendet.

Das Screening mittels NanoString-Technologie basierte auf dem nCounter FLEX Analyse System unter Verwendung des nCounter murine v1.5 miRNA Expression Assay (murines Gesamt-AortenGewebe, murine Zelllinie RAW264.7) bzw. des nCounter human v3 miRNA Expression Assay (humane Zelllinie TIME) in Zusammenarbeit mit Frau Kerstin Körber-Ferl, medizinischtechnische Angestellte des Instituts für Humangenetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Eingesetzt wurden 150 ng isolierte Gesamt-RNA. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Zunächst wurde eine 1:500 Verdünnung der miRNA Assay Controls sowie des Annealing-Master-Mix, bestehend aus 13 µl Annealing Buffer, 26µl nCounter miRNA Tag Reagenz und 6,5 µl 1:500 miRNA Assay Controls-Verdünnung, hergestellt. 3,5 µl Annealing-Master-Mix wurde mit jeweils 3 µl RNA-Probe gemischt und im Thermozykler entsprechend Annealing-Protokoll (94 °C für 1 min, 65 °C für 2 min, 45 °C für 10 min, bei 48 °C halten) inkubiert. Es folgte die Zugabe von 2,5 μl Ligation Master-Mix, bestehend aus 19,5 µl des Reagenz PEG und 13 µl Ligation Buffer, zu den auf 48 °C temperierten Proben. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde 1 µl Ligase zugegeben und das Ligation-Protokoll (48 °C für 3 min, 47 °C für 3 min, 46 °C für 3 min, 45 °C für 5 min, 65 °C für 10 min, bei 4 °C halten) gestartet. Nach dessen Abschluss, wurde 1 µl Ligation Clean-Up zugegeben und das Purifikation-Protokoll (37 °C für 1 h, 70 °C für 10 min, bei 4 °C halten) initiiert. Abschließend wurde jede Probe mit 40 µl RNAse-freiem Wasser versetzt. Dem folgte die Denaturierung der Proben mittels Inkubation im Thermozykler bei 85 °C für 5 min. Für das Hybridisation-Protokoll wurde ein neuer Master-Mix bestehend aus 130 µl Reporter CodeSet und 130 µl Hybridisation Buffer hergestellt. 20 µl von diesem Master-Mix wurden mit 5 µl Probe und 5 µl Capture Probe Set gemischt und im Thermozykler bei 65 °C für 12 h inkubiert. Danach wurden die benötigten Verbrauchsmaterialien aus dem nCounter Master Kit und die vorbereiteten Proben in die nCounter Prep Station eingesetzt. Die Option Life Sciences und das Protokoll mit der höchsten Sensitivität wurden ausgewählt und der Durchlauf gestartet. Nach 3 h wurden die Proben zur Datenanalyse in den nCounter Digital Analyzer überführt. Nach dem Auslesen der CodeSetspezifischen Reporter Library File (RFL), der Einstellung des Sichtfelds der Kamera auf FOV Count = 555 fov (max), dem Eingeben Proben-spezifischer Informationen und der Auswahl der Option "Life Science" sowie der Cartridge Position wurde der Durchlauf gestartet. Die Normalisierung der generierten Daten wurden mit Hilfe der Software nSolver™ Version 3.0 basierend auf den miRNA Assay Controls durchgeführt. Hierbei erfolgte zunächst die Subtraktion des Hintergrund-Rauschens mit Hilfe der mitgeführten Negativ-Kontrollen. Dem folgte zum Ausgleich potenzieller Unterschiede in der Menge der eingesetzte Gesamt-RNA zwischen den Proben eine technische Normalisierung mit Hilfe der mitgeführten Positiv-Kontrollen sowie eine biologische Normalisierung, basierend auf dem Vergleich der 100 am stärksten exprimierten miRNAs und den sogenannten positiven Ligations-Kontrollen, die zu den miRNA Assay Controls zählen. Dabei ergab sich für jede biologische Normalisierung ein Ergebnis, woraus ein Mittelwert gebildet wurde und als Ergebnis weiterverwendet wurde.

#### 3.2.6 miRNA-Validierung

Die Validierung der beim Screening identifizierten stimulationsabhängig verändert exprimierten miRNAs erfolgte durch absolute Quantifizierung mittels QX200<sup>™</sup> ddPCR.

Für die cDNA-Synthese wurde das Universal cDNA Synthese Kit II nach Angaben des Herstellers genutzt. Zur Vorbereitung wurden die gefriergetrocknete Spike-in RNA, UniSp6, sowie die später für die ddPCR benötigten microRNA LNA<sup>™</sup> PCR Primer in 220 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Reverse Transkriptase (RT)-Arbeitslösung wurde aus jeweils 9 µl Nuklease-freiem Wasser, 4 µl 5 x Reaktions-Puffer, 1 µl Enzyme Mix und 2 µl UniSp6 Spike-in RNA hergestellt. 16 µl RT-Arbeitslösung wurden mit 4 µl RNA-Probe (Gesamt-RNA-Konzentration 5 ng/µl) gemischt und im Thermozykler bei 42 °C für 60 min und 95 °C für 5 min und einer anschließenden Abkühlung auf 4 °C inkubiert.

Die ddPCR wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurde für jede der zu analysierenden miRNAs ein Master-Mix hergestellt. Hierzu wurden jeweils 11 µl QX200<sup>™</sup> ddPCR<sup>™</sup> EvaGreen Supermix mit 1,1 µl des entsprechenden microRNA LNA<sup>™</sup> PCR Primers vermischt. Jeweils 12,1 µl Master-Mix wurden zu 9,9 µl verdünnter cDNA-Probe gegeben. Der geeignete Verdünnungsgrad der cDNA war zuvor für jede zu analysierende miRNA in etablierenden ddPCR-Analysen unter Einsatz einer Verdünnungsreihe (1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000 in Nuklease-freiem Wasser) ermittelt worden. 20 µl Proben-Master-Mix-Gemisch und 70µl QX200<sup>™</sup> Droplet Generation Oil for EvaGreen wurden in eine DG8<sup>™</sup> Cartridge gegeben, mit einem DG8<sup>™</sup> Gasket abgedeckt und zur Tröpfchen-Synthese in den QX200<sup>™</sup> Droplet Generator gestellt. Jeweils 40  $\mu$ l dieser Proben-Tröpfchen wurden in eine 96-Well-Platte überführt. Die 96-Well-Platte wurde mit Hilfe des PX1<sup>™</sup> PCR Plate Sealers mit einer Alufolie bei 185 °C für 3 s versiegelt. Die versiegelte 96-Well-Platte wurde in den T100<sup>™</sup> Thermozykler überführt und das ddPCR Amplifizierungs-Protokoll gestartet: 95 °C für 5 min, 40 Zyklen mit abwechselnd 95 °C für 30 s und 58 °C für 1 min mit einer Temperaturanstiegs- bzw. abfallrate von 1,6 °C/s, 4 °C für 5 min, 90 °C für 5 min und bei 4 °C halten. Die Vermessung der Proben erfolgte mit dem QX200<sup>™</sup> Droplet Reader unter Nutzung der QuantaSoft<sup>™</sup> Software. Durch die Software wurde automatisch ein Grenzwert zwischen positiven und negativen Tröpfen ermittelt, der für alle Proben manuell adjustiert wurde. Die Datenausgabe erfolgte in Kopien/ $\mu$ l 1 x ddPCR-Reaktion und wurde basierend auf der einheitlich bei der cDNA-Synthese eingesetzten Gesamt-RNA-Menge von 20 ng auf Kopien/ng Gesamt-RNA umgerechnet.
### 3.2.7 In silico-Analyse

Zur Identifizierung der Zielgene verändert exprimierter miRNAs wurde die Datenbank miRWalk2.0 (http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html) herangezogen. Es wurden sowohl bereits validierte als auch auf Grund von Sequenzanalogien vorhergesagte Zielgene ermittelt. Die erhaltenen Gen-Listen wurden einer GO-Analyse mittels GOrilla (http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/) zu Grunde gelegt. Ergänzend wurden die Gen-Listen händig nach Genen durchsucht, die bekanntermaßen im Zusammenhang mit Sepsis-assoziierten Prozessen, wie Apoptose, Blutdruckregulation, endothelialer Barrierefunktion, Immunabwehr und Signaltransduktion (TLR-Signalweg, JAK-STAT-Signalweg, TNF-Signalweg) stehen. Ferner wurden basierend auf den Datenbanken miRWalk2.0 und miRBase (http://www.mirbase.org/) miRNA-spezifische Informationen bezüglich Genfamilie, Transkription, Genloki und Vorliegen in Gen-Clustern eruiert.

### 3.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism, Version 6 durchgeführt.

Das miRNA-Screening erfolgte bei beiden verwendeten Methoden in einer Zahl biologischer Replikate von N=3 und einer Zahl technischer Replikate von n=1. Zur Identifizierung verändert exprimierter miRNAs wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate ermittelt und das Verhältnis stimulierter und unstimulierter Proben bestimmt. Ein stimuliert/unstimuliert-Verhältnis ≤0,7 wurde als Herunterregulation, ein stimuliert/unstimuliert-Verhältnis ≥1,45 als Hochregulation interpretiert.

Bei der miRNA-Validierung mittels ddPCR wurden ein biologisches Replikat von N=6 und ein technisches Replikat von n=2 eingesetzt. Die Darstellung der Daten erfolgte als arithmetisches Mittel (Mittelwert) inklusive Standardabweichung. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den Analyseproben wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, dem ein Signifikanzniveau p <0,05 zu Grunde gelegt wurde. Die graphische Darstellung der Validierungs-Ergebnisse erfolgte mittels Boxplot. Dieser gibt den Median der ermittelten miRNA-Expressionswerte sowie das untere und obere Quartil und die beiden Extremwerte an.

25

## 4 Ergebnisse

### 4.1 RNA-Konzentration und -Reinheit

Die RNA-Isolation aus Gesamt-Aorten gesunder bzw. septischer C57BL/6J-Mäuse ergab eine Ausbeute von 6,5 µg bis 19,86 µg Gesamt-RNA (Mittelwert 14,5 µg). Aus 2 × 10<sup>6</sup> Zellen der Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 wurden zwischen 33,18 µg und 110,7 µg Gesamt-RNA gewonnen (Mittelwert 54,5 µg). Die Ausbeute ausgehend von 2 × 10<sup>6</sup> Zellen der Endothelzelllinie TIME betrug 9,00 µg bis 42,16 µg Gesamt-RNA (Mittelwert 23,5 µg). Bei allen Proben lag das gemessene 260 nm/230 nm-Verhältnis zwischen 2,0 und 2,2. Für das 260 nm/280 nm-Verhältnis wurde bei allen Proben ein Wert ≥2,0 ermittelt.

## 4.2 Screening

## 4.2.1 Aorten isoliert aus C57BL/6J-Mäusen

Bei der NGS-Untersuchung der aus aortalem Gewebe von C57BL/6J-Mäusen isolierten RNA waren insgesamt 871 miRNAs nachweisbar. Davon wurden 355 miRNAs mit >10 Reads, 233 miRNAs mit >50 Reads, 194 miRNAs mit >100 Reads und 86 miRNAs mit >1000 Reads identifiziert (Abbildung 3). Mittels der NanoString-Technologie konnten insgesamt 566 miRNAs detektiert werden. Davon erzielten 350 miRNAs Werte >10 Reads, 208 miRNAs >50 Reads, 163 miRNAs >100 Reads und 65 miRNAs >1000 Reads (Abbildung 3). Zu beachten ist, dass der verwendete murine NanoString-Assay im Gegensatz zum NGS-Verfahren nicht zwischen miR-3p und miR-5p unterscheidet. Hierdurch mussten bei der vergleichenden Betrachtung der NGS- und NanoString-Daten die Read-Zahlen zweier komplementärer miRNAs (NGS-Verfahren) einer die mittlere Abundanz beider miRNAs abbildenden Read-Zahl (NanoString-Verfahren) gegenübergestellt werden. Der weiteren Analyse wurden ausschließlich miRNAs mit einer Abundanz von mindestens 100 Reads zugrunde gelegt.



Abbildung 3) Aorten (C57BL/6J-Mäuse): miRNA-Abundanz.

Die vergleichende Betrachtung der NGS- und NanoString-Daten ergab 143 miRNAs, die in beiden Screening-Verfahren mit einer Abundanz von >100 Reads detektiert wurden. Hiervon zeigten 116 miRNAs sowohl mittels NGS-Untersuchung als auch mittels NanoString-Verfahren stabile Expressionsraten beim Vergleich aortaler Proben gesunder bzw. septischer C57BL/6J-Mäuse (Expressionsrate <1,45fach und >0,7fach). Bei 9 miRNAs war übereinstimmend bei beiden genutzten Screening-Verfahren eine Sepsis-induzierte Veränderung der Expressionsrate zu beobachten. betraf die miRNAs mmu-miR-132-3p, Dies mmu-miR-144-3p, mmu-miR-144-5p, mmu-miR-200a-3p, mmu-miR-200b-3p, mmu-miR-200c-3p, mmu-miR-203-5p, mmu-miR-205-5p und mmu-miR-429-3p (Tabelle 1). Bei der in silico-Analyse dieser miRNAs konnten für 3 dieser miRNAs (mmu-miR-132-3p, mmu-miR-144-3p und mmu-miR-200c-3p) Sepsis-assoziierte Zielgene identifiziert werden, sodass diese miRNAs als Validierungs-Kandidaten ausgewählt wurden. Sepsis-assoziierte Zielgene wurden zudem für die tendenziell vermindert exprimierte miRNA mmu-miR-15b-5p angezeigt, sodass diese miRNA ebenfalls in die Gruppe der Validierungs-Kandidaten aufgenommen wurde (Tabelle 1). Bei 17 miRNAs erbrachten die beiden eingesetzten Screening-Verfahren widersprüchliche Angaben.

Bei einigen miRNAs wurde das den Analysen zugrunde gelegte Detektionslimit von >100 Reads nur bei einer der beiden verwendeten Screening-Methoden erreicht. Insgesamt 38 miRNAs, die im NGS-Verfahren eine Abundanz >100 Reads erzielten, unterschritten dieses Detektionslimit bei der Analyse mittels NanoString-Technologie. Von diesen zeigten 21 miRNAs beim Vergleich aortaler Proben gesunder bzw. septischer C57BL/6J-Mäuse in beiden Verfahren stabile Expressionsraten (<1,45fach und > 0,7fach). 2 miRNAs waren bei beiden Analyseverfahren Sepsis-induziert durch eine verminderte Expression (≤0,7fach) gekennzeichnet (Anlagen, Tabelle 6). Bei den restlichen 15 miRNAs erbrachten NGS- und NanoString-Verfahren widersprüchliche Daten.

Insgesamt 45 miRNAs überschritten das Detektionslimit (>100 Reads) nur beim NanoString-Verfahren, nicht aber bei der NGS-Untersuchung. Hiervon zeigten 8 miRNAs Sepsis-unabhängig in beiden Verfahren eine stabile Expression (<1,45fach und > 0,7fach). Die restlichen 37 miRNAs waren durch widersprüchliche Ergebnisse der zwei genutzten Screening-Methoden gekennzeichnet.

13 der durch das NGS-Verfahren mit einer Abundanz >100 Reads detektierten miRNAs waren nicht durch den nCounter murine v1.5 miRNA Expression Assay abgedeckt und konnten daher nicht mittels NanoString-Verfahren analysiert werden. Die Auswertung der NGS-Daten dieser

27

miRNAs indizierte in keinem Fall Expressionsunterschiede beim Vergleich aortaler Proben gesunder versus septischer C57BL/6J-Mäuse.

|               | NGS-Untersuchung |          | NanoString-Technologie |         |          |                |
|---------------|------------------|----------|------------------------|---------|----------|----------------|
|               | gesund           | septisch | Verhältnis             | gesund  | septisch | Verhältnis     |
| miRNA         | [Reads]          | [Reads]  | [sept./gesund]         | [Reads] | [Reads]  | [sept./gesund] |
| miR-15b       |                  |          |                        | 3294    | 2585     | 0,78           |
| ≻ miR-15b-5p  | 1426             | 981      | 0,69                   |         |          |                |
| miR-132       |                  |          |                        | 328     | 519      | 1,58           |
| ≽ miR-132-3p  | 110              | 185      | 1,68                   |         |          |                |
| miR-144       |                  |          |                        | 1584    | 1068     | 0,67           |
| ≻ miR-144-3p  | 124              | 80       | 0,65                   |         |          |                |
| ≽ miR-144-5p  | 1036             | 671      | 0,65                   |         |          |                |
| miR-200a      |                  |          |                        | 314     | 39       | 0,13           |
| ≽ miR-200a-3p | 338              | 6        | 0,02                   |         |          |                |
| miR-200b      |                  |          |                        | 281     | 88       | 0,31           |
| ≻ miR-200b-3p | 335              | 7        | 0,02                   |         |          |                |
| miR-200c      |                  |          |                        | 149     | 42       | 0,28           |
| ≽ miR-200c-3p | 163              | 17       | 0,10                   |         |          |                |
| miR-203       |                  |          |                        | 343     | 195      | 0,57           |
| ≽ miR-203-5p  | 148              | 89       | 0,60                   |         |          |                |
| miR-205       |                  |          |                        | 1346    | 34       | 0,03           |
| ≽ miR-205-5p  | 207              | 2        | 0,01                   |         |          |                |
| miR-429       |                  |          |                        | 208     | 1        | 0,01           |
| ≽ miR-429-3p  | 126              | 3        | 0,03                   |         |          |                |

Tabelle 1) Aorten (C57BL/6J-Mäuse): miRNAs mit Sepsis-induziert veränderter Expression

# 4.2.2 Murine Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7

Bei der Untersuchung der ausgehend von der Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 gewonnen RNA mittels NGS wurden insgesamt 775 miRNAs nachgewiesen. Davon wurden 326 miRNAs mit >10 Reads, 205 miRNAs mit >50 Reads, 159 miRNAs mit >100 Reads und 85 miRNAs mit >1000 Reads identifiziert. Mit Hilfe der NanoString-Technologie waren 566 miRNAs nachweisbar. Davon wurden 354 miRNAs mit >10 Reads, 166 miRNAs mit

>50 Reads, 133 miRNAs mit >100 Reads und 42 miRNAs mit >1000 Reads detektiert (Abbildung 4). Zu beachten ist, dass der verwendete murine NanoString-Assay im Gegensatz zum NGS-Verfahren nicht zwischen miR-3p und miR-5p unterscheidet. Hierdurch mussten bei der vergleichenden Betrachtung der NGS- und NanoString-Daten die Read-Zahlen zweier komplementärer miRNAs (NGS-Verfahren) einer die mittlere Abundanz beider miRNAs abbildenden Read-Zahl (NanoString-Verfahren) gegenübergestellt werden. Der weiteren Analyse wurden ausschließlich miRNAs mit einer Abundanz von mindestens 100 Reads zugrunde gelegt.



Abbildung 4) RAW264.7: miRNA-Abundanz.

Bei der vergleichenden Betrachtung der NGS- und NanoString-Daten wurden 116 miRNAs identifiziert, die in beiden Screening-Verfahren mit einer Abundanz von >100 Reads detektiert wurden. 55 miRNAs hiervon waren beim Vergleich zwischen LPS-behandelten und unstimulierten RAW264.7 durch stabile Expressionsraten (<1,45fach und >0,7fach) gekennzeichnet. Bei insgesamt 10 miRNAs trat in Folge einer LPS-Behandlung der RAW264.7 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bei beiden genutzten Screening-Verfahren übereinstimmend eine Veränderung der Expression auf. Dies betraf die miRNAs mmu-miR-9-3p, mmu-miR-9-5p, mmu-miR-27b-3p, mmu-miR-27b-5p, mmu-miR-93-5p, mmu-miR-99b-5p, mmu-miR-106b-5p, mmu-miR-221-3p, mmu-miR-322-5p und mmu-miR-1198-5p (Tabelle 2). Bei der in silico-Analyse dieser miRNAs konnten für sechs dieser (mmu-miR-9-5p, mmu-miR-27b-3p, mmu-miR-93-5p, miRNAs mmu-miR-106b-5p, mmu-miR-221-3p und mmu-miR-1198-5p) Sepsis-assoziierte Zielgene identifiziert werden. Ferner zeichnete sich für die miRNAs mmu-miR-15b-3p, mmu-miR-15b-5p, mmu-miR-16-5p, mmu-miR-25-3p und mmu-miR-221-5p bei beiden Screening-Verfahren eine Tendenz zur LPSinduziert verminderten Expression ab (Tabelle 2). Da im Rahmen der in silico-Analyse für mmu-miR-15b-5p, mmu-miR-16-5p und mmu-miR-221-5p Sepsis-assoziierte Zielgene detektiert wurden, wurden auch diese miRNAs als Validierungs-Kandidaten ausgewählt. Für 46 miRNAs ergaben die beiden genutzten Screening-Verfahren widersprüchliche Daten.

|               | NGS-Untersuchung |           |                | NanoString-Technologie |           |                |
|---------------|------------------|-----------|----------------|------------------------|-----------|----------------|
|               | unstim.          | LPS-stim. | Verhältnis     | unstim.                | LPS-stim. | Verhältnis     |
| miRNA         | [Reads]          | [Reads]   | [LPS-/unstim.] | [Reads]                | [Reads]   | [LPS-/unstim.] |
| miR-9         |                  |           |                | 588                    | 308       | 0,52           |
| ≻ miR-9-3p    | 225              | 130       | 0,58           |                        |           |                |
| ≻ miR-9-5p    | 1735             | 1042      | 0,60           |                        |           |                |
| miR-15b       |                  |           |                | 19001                  | 14489     | 0,76           |
| ≻ miR-15b-3p  | 317              | 214       | 0,68           |                        |           |                |
| ≻ miR-15b-5p  | 7007             | 4896      | 0,70           |                        |           |                |
| miR-16        | 1520             | 10800     | 0,69           | 43936                  | 31574     | 0,72           |
| ≻ miR-16-5p   |                  |           |                |                        |           |                |
| miR-25        |                  |           |                | 3651                   | 2730      | 0,75           |
| ≽ miR-25-3p   | 4225             | 2438      | 0,58           |                        |           |                |
| miR-27b       |                  |           |                | 1193                   | 630       | 0,53           |
| ≻ miR-27b-3p  | 127605           | 81865     | 0,64           |                        |           |                |
| ≻ miR-27b-5p  | 609              | 422       | 0,69           |                        |           |                |
| miR-93        |                  |           |                | 688                    | 456       | 0,66           |
| ≻ miR-93-5p   | 6022             | 3067      | 0,51           |                        |           |                |
| miR-99b       |                  |           |                | 775                    | 1555      | 2,01           |
| ≻ miR-99b-5p  | 3781             | 6848      | 1,81           |                        |           |                |
| miR-106b      |                  |           |                | 757                    | 530       | 0,70           |
| ≻ miR-106b-5p | 472              | 297       | 0,63           |                        |           |                |
| miR-221       |                  |           |                | 4777                   | 3011      | 0,63           |
| ≽ miR-221-3p  | 13057            | 9139      | 0,70           |                        |           |                |
| ≽ miR-221-5p  | 1510             | 1077      | 0,70           |                        |           |                |
| miR-322       |                  |           |                | 945                    | 500       | 0,53           |
| ≻ miR-322-5p  | 195              | 122       | 0,63           |                        |           |                |
| miR-1198      |                  |           |                | 137                    | 84        | 0,61           |
| ≻ miR-1198-5p | 233              | 150       | 0,64           |                        |           |                |

Tabelle 2) RAW264.7: miRNAs mit LPS-induziert veränderter Expression.

Bei einigen miRNAs wurde das festgelegte Detektionslimit von >100 Reads nur bei einer der beiden verwendeten Screening-Methoden erreicht. 30 miRNAs wurden nur im NGS-Verfahren, nicht aber mittels NanoString-Technologie mit >100 Reads detektiert. Für 5 dieser miRNAs zeigten beide Screening-Verfahren eine stabile Expression (<1,45fach und >0,7fach). Jeweils 1 miRNA wurde in beiden Screening-Methoden mit einer verminderten (≤0,7fach) bzw. gesteigerten (≥1,45fach) Expressionsrate nachgewiesen (Anlage, Tabelle 7). Bei 23 miRNAs erbrachten NGS- und NanoString-Verfahren widersprüchliche Ergebnisse.

42 miRNAs überschritten das Detektionslimit (>100 Reads) nur bei der NanoString-Analyse. Hiervon wiesen 6 miRNAs eine stabile Expression (<1,45fach und >0,7fach) in beiden Verfahren auf. Bei 2 miRNAs wurde eine gesteigerte Expression (≥1,45fach) nachgewiesen (Anlage, Tabelle 7). Die weiteren 34 miRNAs ergaben in den beiden Screening-Methoden widersprüchliche Daten.

13 der durch das NGS-Verfahren mit einer Abundanz >100 Reads detektierten miRNAs waren nicht durch den nCounter murine v1.5 miRNA Expression Assay der NanoString-Analyse abgedeckt. Von diesen zeigte in Folge der LPS-Behandlung der Zellen 1 miRNA eine verminderte Expression (≤0,7fach) (Anlagen, Tabelle 8). Die restlichen 12 miRNAs ergaben in beiden Screening-Methoden widersprüchliche Ergebnisse.

### 4.2.3 Humane Endothelzelllinie TIME

Bei der NGS-Analyse der ausgehend von der Zytokin-stimulierten Endothelzelllinie TIME isolierten RNA waren insgesamt 1185 miRNAs nachweisbar. Davon wurden 375 miRNAs mit >10 Reads, 247 miRNAs mit >50 Reads, 197 miRNAs mit >100 Reads und 77 miRNAs mit >1000 Reads identifiziert. Mittels der NanoString-Technologie konnten 798 miRNAs detektiert werden. Davon erzielten 262 miRNAs Werte >10 Reads, 130 miRNAs >50 Reads, 98 miRNAs >100 Reads und 30 miRNAs >1000 Reads (Abbildung 5).

Die vergleichende Betrachtung der NGS- und NanoString-Daten ergab 83 miRNAs, die in beiden Screening-Verfahren mit einer Abundanz von >100 Reads detektiert wurden. Hiervon zeigten 7 miRNAs sowohl mittels NGS- als auch mittels NanoString-Verfahren stabile Expressionsraten ( $\leq$ 1,45fach und  $\geq$ 0,7fach) beim Vergleich Zytokin-stimulierter TIME mit der unstimulierten Kontrolle. Bei 14 miRNAs wurde bei beiden genutzten Screening-Verfahren übereinstimmend eine Zytokin-induziert gesteigerte Expression ( $\geq$ 1,45fach) detektiert: hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-221-5p und hsa-miR-342-3p (Tabelle 3). Im Rahmen der *in silico*- Analyse konnten mit Ausnahme von hsa-miR-342-3p für jede dieser miRNAs Sepsis-assoziierte Zielgene identifiziert werden. Bei 62 miRNAs erbrachten die beiden eingesetzten Screening-Verfahren widersprüchliche Angaben.



Abbildung 5) TIME: miRNA-Abundanz.

Bei einigen miRNAs wurde das den Analysen zugrunde gelegte Detektionslimit von >100 Reads nur bei einer der beiden verwendeten Screening-Methoden erreicht. So erzielten 79 miRNAs nur in der NGS-Untersuchung nicht aber bei der NanoString-Analyse die gewünschte Abundanz. Von diesen zeigten 15 miRNAs in beiden Verfahren eine gesteigerte Expressionsrate ( $\geq$ 1,45fach) in Zytokin-stimulierten im Vergleich zu unstimulierten TIME (Anlagen, Tabelle 9). Bei 3 miRNAs wurde eine verminderte Expression ( $\leq$ 0,7fach) detektiert (Anlagen, Tabelle 9). 6 miRNAs wurden in beiden Verfahren mit stabilen Expressionsraten ( $\leq$ 1,45fach und  $\geq$ 0,7fach) nachgewiesen. Für 55 miRNAs wurden im NGS- und NanoString-Verfahren abweichende Expressionsraten detektiert.

15 miRNAs überschritten das Detektionslimit lediglich beim NanoString-Verfahren. Für 1 miRNA indizierten beide Screening-Methoden eine Steigerung der Expressionsrate (≥1,45fach) in Folge einer Zytokinbehandlung der Zellen (Anlagen, Tabelle 9). Die restlichen 14 miRNAs ergaben gegensätzliche Expressionsraten im NGS- und NanoString-Verfahren.

Zudem wurden 35 miRNAs durch das NGS-Verfahren mit einer Abundanz >100 Reads identifiziert, die nicht Teil des genutzten NanoString-Panels (nCounter human v3 miRNA Expression Assay) waren. Von diesen waren in Zytokin-behandelten TIME im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle 1 miRNA vermindert ( $\leq 0,7$ fach) und 26 miRNAs gesteigert ( $\geq 1,45$ fach) exprimiert (Anlagen, Tabelle 10). 8 miRNAs ergaben eine stabile Expressionsrate ( $\leq 1,45$ fach und  $\geq 0,7$ fach).

|               | NGS-Untersuchung   |                              |                                      | NanoString-Technologie |                              |                                      |
|---------------|--------------------|------------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| miRNA         | unstim.<br>[Reads] | Zytokin-<br>stim.<br>[Reads] | Verhältnis<br>[Zytokin-/<br>unstim.] | unstim.<br>[Reads]     | Zytokin-<br>stim.<br>[Reads] | Verhältnis<br>[Zytokin-/<br>unstim.] |
| miR-21-5p     | 233216             | 513036                       | 2,20                                 | 5114                   | 11625                        | 2,27                                 |
| miR-23b-3p    | 1122               | 1838                         | 1,64                                 | 139                    | 236                          | 1,70                                 |
| miR-26b-5p    | 2562               | 4835                         | 1,89                                 | 117                    | 331                          | 2,82                                 |
| miR-29a-3p    | 4304               | 16713                        | 3,88                                 | 848                    | 1626                         | 1,92                                 |
| miR-29b-3p    | 47                 | 251                          | 5,33                                 | 6646                   | 19868                        | 2,99                                 |
| miR-30d-5p    | 5243               | 7904                         | 1,51                                 | 91                     | 315                          | 3,46                                 |
| miR-30e-5p    | 1270               | 2045                         | 1,61                                 | 40                     | 126                          | 3,14                                 |
| miR-106b-5p   | 163                | 337                          | 2,07                                 | 99                     | 155                          | 1,57                                 |
| miR-146a-5p   | 3805               | 13490                        | 3,55                                 | 908                    | 2071                         | 2,28                                 |
| miR-155-5p    | 2497               | 15988                        | 6,40                                 | 256                    | 1246                         | 4,86                                 |
| miR-181a-5p   | 4864               | 13253                        | 2,72                                 | 1801                   | 3032                         | 1,68                                 |
| miR-181b/d-5p |                    |                              |                                      | 100                    | 201                          | 2,00                                 |
| ≻ miR-181b-5p | 1574               | 6107                         | 3,88                                 |                        |                              |                                      |
| miR-221-5p    | 664                | 2415                         | 3,64                                 | 16                     | 201                          | 12,18                                |
| miR-342-3p    | 174                | 301                          | 1,73                                 | 96                     | 220                          | 2,28                                 |

# Tabelle 3) TIME: miRNAs mit Zytokin-induziert veränderter Expression

# 4.3 Validierung

# 4.3.1 Aorten isoliert aus C57BL/6J-Mäusen

Basierend auf den beim Screening erhaltenen Daten wurden die miRNAs mmu-miR-15b-5p, mmu-miR-132-3pmmu-miR-144-3p und mmu-miR-200c-3p einer Validierung mittels ddPCR unterzogen.

Bei den miRNAs mmu-miR-15b-5p und mmu-miR-144-3p konnte keine Sepsis-induzierte Änderung der Expression im aortalen Gewebe beobachtet werden (Abbildung 6). Das Verhältnis der Kopien an mmu-miR-15b-5p je ng isolierter Gesamt-RNA betrug bei septischen C57BL/6-Mäusen im Vergleich zu gesunden Tieren 1,0. Bei der mmu-miR-144-3p wurde ein Verhältnis von 0,6 ermittelt. Aufgrund der breiten Streuung der Werte der gesunden Tiere war dieser Unterschied allerdings nicht signifikant (p <0,5).

Für die mmu-miR-132-3p zeigte sich ein Trend hinsichtlich einer gesteigerten Expression im aortalen Gewebe septischer C57BL/6-Mäuse im Vergleich zu gesunden Tieren (Abbildung 6). Die Expressionsrate war bei septischen Mäusen um den Faktor 1,8 erhöht (p <0,06). Die mmu-miR-200c-3p konnte nicht mittels ddPCR detektiert werden.



Abbildung 6) miRNA-Expression in Aorten (C57BL/6-Mäuse).

## 4.3.2 Murine Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7

Basierend auf den beim Screening erhaltenen Daten wurden die miRNAs mmu-miR-9-5p, mmu-miR-15b-5p, mmu-miR-16-5p, mmu-miR-27b-3p, mmu-miR-93-5p, mmu-miR-106b-5p, mmu-miR-221-3p, mmu-miR-221-5p und mmu-miR-1198-5p einer Validierung mittels ddPCR unterzogen. Die miRNAs mmu-miR-221-5p und mmu-miR-1198-5p zeigten keine LPS-induzierte Änderung der Expression. Das Verhältnis der Kopien der miRNAs je ng isolierter Gesamt-RNA unstimulierter RAW264.7 im Vergleich zu LPS-stimulierten Zellen betrug bei beiden miRNAs 0,9. Für die restlichen untersuchten miRNAs wurde hingegen in Übereinstimmung mit den beim



Screening erhaltenen Daten LPS-induziert eine signifikant verminderte Expression beobachtet (Abbildung 7). Die Expressionsraten von mmu-miR-9-5p, mmu-miR-15b-5p, mmu- miR-27b-3p

Abbildung 7) miRNA-Expression muriner Monozyten/Makrophagen (RAW264.7).

und mmu-miR106b-5p waren im Vergleich zu unstimulierten Zellen um den Faktor 0,6 und die Expressionsrate von mmu-miR-93-5p um den Faktor 0,7 erniedrigt. Bei den miRNAs mmu-miR-16-5p und mmu-miR-221-3p konnte eine Verminderung der Expression in Folge einer LPS-Behandlung der RAW264.7 um 20% beobachtet werden.

### 4.3.3 Humane Endothelzelllinie TIME

Basierend auf den beim Screening erhaltenen Daten wurden die miRNAs hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p und hsa-miR-221-5p einer Validierung mittels ddPCR unterzogen.

Nicht-signifikante Veränderungen der Expressionsraten in Folge einer Zytokin-Behandlung der TIME wurde für die miRNAs hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-181a-5p und hsa-miR-181b-5p beobachtet. Die Expression der hsa-miR-146a-5p war Zytokin-induziert im Vergleich zu unstimulierten Zellen um den Faktor 1,2 erhöht. Bei den anderen genannten miRNAs trat hingegen bei Zytokin-stimulierten TIME eine Verminderung der Expression ein. Die Reduktion der Expressionsrate betrug bei hsa-miR-106b-5p und hsa-miR-181b-5p 30%, bei hsa-miR-26b-5p und hsa-miR-30e-5p 20% sowie bei hsa-miR-181a-5p 10%. Aufgrund der breiten Streuung der ermittelten Werte waren diese Änderungen der miRNA-Expression allerdings nicht signifikant.

Eine signifikante Verminderung (p <0,03) der Expression bei Zytokin-behandelten TIME wurde bei den miRNAs hsa-miR-23b-3p und hsa-miR-30d-5p festgestellt (Abbildung 8). Bei beiden miRNAs reduzierte sich die Expressionsrate in Folge einer Zytokin-Stimulation im Vergleich zu unstimulierten TIME um den Faktor 0,6. Zudem konnte Zytokin-induziert bei den miRNAs hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-155-5p und hsa-miR-221-5p eine signifikante Steigerung der Expression beobachtet werden (Abbildung 8). In stimulierten TIME war die Expression von hsa-miR-29a-3p 1,9fach (p <0,03), von hsa-miR-29b-3p 2,5fach (p <0,02), von hsa-miR-155-5p 2,1fach (p <0,03) und von hsa-miR-221-5p 4,2fach (p <0,004) erhöht.

Die hsa-miR-21-5p konnte nicht mittels ddPCR detektiert werden.



Abbildung 8) miRNA-Expression humaner Endothelzellen (TIME).

# 4.4 In silico-Analyse

# 4.4.1 Aorten isoliert aus C57BL/6J-Mäusen

Da für keine der mittels ddPCR untersuchten miRNAs ein statistisch signifikanter Expressionsunterschied im aortalen Gewebe gesunder bzw. septischer C57BL/6J-Mäuse gefunden wurde, wurde keine *in silico*-Analyse nach validierten und mutmaßlichen Zielgenen durchgeführt.

### 4.4.2 Murine Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7

Mittels *in silico*-Analyse wurden für die durch die ddPCR als verändert exprimiert identifizierten miRNAs sowohl die bislang validierten als auch die putativen Zielgene ermittelt, die in Zusammenhang mit Sepsis-assoziierten Prozessen der Makrophagen stehen. Im Fokus standen die Aktivierung der Immunzellen via TLR-Signalweg, die Induktion typischer Abwehrreaktionen (u.a. Synthese antimikrobieller Substanzen, Zytokin- und Chemokin-Produktion, oxidativer Burst) sowie die Auslösung der Apoptose der Makrophagen.

Die Anzahl aller mit Hilfe der Datenbank miRWalk2.0 identifizierten Zielgene ist für die untersuchten miRNAs in Tabelle 4 dargestellt. Eine GO-Analyse (mittels GOrilla) dieser Zielgene ergab keine Häufung immunologisch bedeutsamer miRNA-Ziele. Aus diesem Grund wurden die Zielgen-Listen im Anschluss manuell ausgewertet. Hierbei konnte eine Reihe validierter und putativer Zielgene identifiziert werden, die mit den o.g. immunologischen Prozessen in Zusammenhang stehen.

|                 | validierte Zielgene | putative Zielgene |
|-----------------|---------------------|-------------------|
| mmu-miR-9-5p    | 522                 | 802               |
| mmu-miR-15b-5p  | 28                  | 629               |
| mmu-miR-16-5p   | 41                  | 628               |
| mmu-miR-27b-3p  | 27                  | 1277              |
| mmu-miR-93-5p   | 24                  | 849               |
| mmu-miR-106b-5p | 25                  | 666               |
| mmu-miR-221-3p  | 27                  | 702               |

Tabelle 4) Anzahl mittels miRWalk2.0 identifizierter Zielgene validierter muriner miRNAs

Die manuelle Analyse der Zielgen-Listen ergab die IRAK-4, ein elementarer Teil der TLR-4-Signaltransduktion (Dunne et al. 2010), als mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-93-5p und die IRAK-2, die für eine anhaltende Signaltransduktion nach TLR-4-Aktivierung erforderlich ist (Wan et al. 2009), als ein mutmaßliches Zielgen der mmu-miR-15b-5p, der mmu-miR-16-5p und der mmu-miR-93-5p. Inhibitor  $\kappa$ B Kinase (IKK)-beta (IKK- $\beta$ ) wurde als ein mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-106b-5p, IKK-γ als ein mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-93-5p und IKK-assoziiertes Protein 1 (IKAP) als mutmaßliches Zielgen mmu-miR-15b-5p von und mmu-miR-16-5p identifiziert. Zusammen bilden ΙΚΚ-α, ΙΚΚ-β und ΙΚΚ-γ mit dem Scaffold-Protein IKAP den IKK-Komplex, der die Phosphorylierung der Nuclear Factor κB Inhibitors (IκBs) vermittelt und somit an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkB beteiligt ist (Israël 2010).

Weiterhin wurden  $I\kappa B-\beta$  als mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-27b-3p,  $I\kappa B-\zeta$  als mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-93-5p,  $I\kappa B-\delta$  als mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-221-3p und die NF $\kappa$ B-Untereinheit p50 als mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-15b-5p und mmu-miR-16-5p ermittelt.

Der TNF Rezeptor-assoziierte Faktor (TRAF)-3, der im Rahmen eines alternativen Weges der TLRvermittelten Signaltransduktion die Induktion anti-inflammatorischer Zytokine, wie INF-β und IL-10 vermittelt (King et al. 2017), konnte als validiertes Zielgen von mmu-miR-9-5p identifiziert werden. Weiterhin wurden TRAF3-bindendes Protein-2 (TRAF3IP2) (potenziell beeinflusst durch mmu-miR-221-3p) und der Interferon Regulatory Factor (IRF)-3 (potenziell beeinflusst von mmumiR-15b-5p und mmu-miR-16-5p) als Zielgene ermittelt.

Überdies zeigte sich, dass die MAP-Kinasen und ihre Substrate der post-transkriptionellen Regulation der nach LPS-Stimulation der RAW264.7 verändert exprimierten miRNAs unterliegen. Die MAP-Kinase p38-α wurde als validiertes Zielgen von mmu-miR-106b-5p und mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-93-5p, die Extrazellular-Signal Regulated Kinase (ERK)-4 als validiertes Zielgen von mmu-miR-95p sowie die Jun-N-Terminal Kinase (JNK)-2 und die ERK-1 als mutmaßliche Zielgene von mmu-miR-93-5p identifiziert. Auch das MAPK8-interagierendes Protein 2 (MAPK8IP2), ein an der Aktivierung von JNK-1 beteiligtes Scaffold-Protein (Prakasam et al. 2014), wurde als mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-15b-5p und mmu-miR-16-5p ermittelt. Von den Substraten der MAP-Kinasen wurden MAP-Kinase-Activated Protein Kinase (MK)-2 als mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-95p, Jun Proto-Oncogene (JUN) als validiertes Zielgen von mmu-miR-16-5p, FOS Like-1 (FOSL1) als mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-15b-5p und mmu-miR-16-5p sowie FBJ Osteosarcoma Oncogene B (FOSB) als mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-27b-3p festgestellt.

Die in Folge eine LPS-Behandlung von RAW264.7 verändert exprimierten miRNAs sowie deren Signaltransduktions-assoziierten Zielgene sind in Abbildung 9 in Form einer Übersicht dargestellt.

Ferner wurden mehrere Mitglieder der B-Cell Leukemia-2 (BCL-2)-Familie als Zielgene ermittelt, welche eine Rolle bei der Regulation des intrinsischen Wegs der Apoptose spielen (Ola et al. 2011): BCL-2 (validiertes Zielgen von mmu-miR-16-5p, mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-15b-5p und mmu-miR-221-3p), BCL-2 Like Protein-2 (BCL2L2; validiertes Zielgen von mmu-miR-15b-5p und mmu-miR-16-5p), BCL2L10 (mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-15b-5p und mmu-miR-16-5p), BCL2L10 (mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-15b-5p und mmu-miR-16-5p), BCL2L11 (validiertes Zielgen von mmu-miR-106b-5p), BCL2L14 (mutmaßliches Zielgen von mu-miR-106b-5p), BCL2L14 (mutmaßliches

mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-93-5p) sowie BCL2-Associated Transkription Factor 1 (BCLAF1; validiertes Zielgen von mmu-miR-9-5p). Zudem wurde der TNF-Rezeptor-1 (mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-9-5p) als Zielgen identifiziert, der das Adapterprotein Fas-Associated Death Domain (FADD) (mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-9-5p, mmu-miR-15b-5p, mmu-miR-16-5p, mmu-miR-106b-5p) aktiviert und so die extrinsische Zell-Apoptose induziert (Müller-Esterl 2018e). Eine Übersicht befindet sich in Abbildung 9.



Abbildung 9) Zielgene validierter muriner miRNAs: TLR-4- und MAPK-Signalweg, Apoptose.

Weiterhin wurden Zielgene identifiziert, die das inflammatorische Potential von Monozyten/Makrophagen beeinflussen. Hierzu zählen das Integrin  $\alpha$ -4 (validiertes Zielgen von mmu-miR-9-5p, mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-27b-3p), die iNOS und die NADPH Oxidase (NOX)-1 (mutmaßliche Zielgene von mmu-miR-93-5p), INF-γ (mutmaßliches Zielgen von mmumiR-9-5p und mmu-miR-221-5p), TNF-α (mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-27b-3p), IL-10 (mutmaßliches mmu-miR-27b-3p Zielgen und von

mmu-miR-106b-5p), die CC-Chemokinliganden (CCL)-2, -4, -22 (mutmaßliche Zielgene von mmumiR-27b-3p) sowie die IL-10-Rezeptor-Untereinheiten-alpha (IL10RA; mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-15b-5p und mmu-miR-16-5p) und -beta (IL10RB; validiertes Zielgen von mmu-miR-93-5p und mmu-miR-106b-5p, mutmaßliches Zielgen von mmu-miR-9-5p und mmu-miR-221-3p).

#### 4.4.3 Humane Endothelzelllinie TIME

Für die mit Hilfe der ddPCR als verändert exprimiert identifizierten miRNAs wurde basierend auf einer *in silico*-Analyse die bislang validierten als auch die putativen Zielgene ermittelt, die in Zusammenhang mit der Sepsis-induzierten endothelialen Dysfunktion stehen. Dies umfasste die Aktivierung der Zellen via IL-1- und JAK-STAT-Signalweg, die Induktion typischer Abwehrreaktionen (u.a. Synthese von Adhäsionsfaktoren, Zytokin- und Chemokin-Produktion, oxidativer Burst), die Auslösung der Apoptose der Endothelzellen u.a. über Aktivierung der Rezeptoren der TNF-Familie sowie die Expression vasoaktiver Rezeptoren.

|                | Validierte Zielgene | putative Zielgene |
|----------------|---------------------|-------------------|
| hsa-miR-23b-3p | 303                 | 979               |
| hsa-miR-29a-3p | 217                 | 549               |
| hsa-miR-29b-3p | 221                 | 551               |
| hsa-miR-30d-5p | 353                 | 1250              |
| hsa-miR-155-5p | 886                 | 717               |
| hsa-miR-221-5p | 115                 | 770               |

Tabelle 5) Anzahl mittels miRWalk2.0 identifizierter Zielgene validierter humaner miRNAs.

Die Anzahl aller mit Hilfe der Datenbank miRWalk2.0 identifizierten Zielgene ist für die untersuchten miRNAs in Tabelle 5 dargestellt. Die GO-Analyse (mittels GOrilla) dieser Zielgene ergab bei den miRNAs hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-155-5p und hsa-miR-221-5p eine Häufung von miRNA-Zielen, die für grundlegende endotheliale Funktionen von Bedeutung sind. Die 1250 putativen Zielgene der hsa-miR-30d-5p wurden verstärkt mit den GO-Begriffen »Regulation der Gefäßweite« und »α-Adrenozeptor Aktivität« in Verbindung gebracht. Die GO-Analyse der 717 putativen Zielgene der hsa-miR-155-5p ergab ein gehäuftes Auftreten der GO-Begriffe »Blutdruckregulation«, »Zellaktivierung in Verbindung mit der Immunantwort« sowie »Zelladhäsion«. Und die 770 mutmaßliche Zielgene der hsa-miR-221-5p waren bei der GO-Analyse durch ihre Assoziation mit dem GO-Begriff »Regulation von Endothelzellmigration in Blutgefäßen« gekennzeichnet.

41

Die manuelle Analyse der Zielgen-Listen ergab den INF-y-Rezeptor 1 (IFNGR1) als validiertes Ziel der hsa-miR-155-5p und den IL-6-Rezeptor (IL6R) als putatives Zielgen der hsa-miR-155-5p und hsa-miR-23b-3p. Die JAK-1, die nach Aktivierung der INF-γ- oder IL-6-Rezeptorkomplexe sich selbst und anschließend zytosolische STATs phosphoryliert (Schindler et al. 2007), wurde als validiertes Zielgen der hsa-miR-23b-5p und der hsa-miR-30d-5p identifiziert. STATs translozieren nach ihrer Phosphorylierung als Homo- oder Heterodimere in den Zellkern und wirken dort als Transkriptionsfaktoren (Schindler et al. 2007). STAT-2 wurde als validiertes Zielgen der hsa-miR-221-5p, STAT-3 als validiertes Zielgen der hsa-miR-155-5p, STAT-5 als validiertes Zielgen der hsamiR-23b-3p und STAT-1 als putatives Zielgen der hsa-miR-30d-5p identifiziert. Weiterhin wurden Suppressor Of Cytokine Signalling (SOCS)-1 und SOCS-3 als validierte Zielgene von hsa-miR-30d-5p sowie hsa-miR-155-5p, SOCS-6 als validiertes Zielgen der hsa-miR-23b-3p und SOCS-5 als mutmaßliches Zielgen der hsa-miR-155-5p ermittelt. SOCS sind innerhalb einer negativen Feedbackschleife bei der Vermittlung der INF-γ-Wirkung von Bedeutung (Kazi et al. 2014). Die in Folge einer Aktivierung der Klasse I Zytokin-Rezeptoren nach Stimulation von Endothelzellen mit pro-inflammatorischen Zytokinen verändert exprimierten miRNAs sowie deren Signaltransduktion-assoziierten Zielgene sind in Abbildung 10 in Form einer Übersicht dargestellt.



Abbildung 10) Zielgene validierter humaner miRNAs: JAK-STAT-Signalweg.

Zudem ergab die manuelle Analyse der Zielgen-Listen die Identifizierung des IL-1 Rezeptorassoziiertes Protein (IL1RAP), das für die Aktivierung des IL-1 induzierten Signaltransduktion essentiell ist (Dale et al. 1998), als mutmaßliches Zielgen der hsa-miR-29a-3p und hsa-miR-29b-3p. Das Adaptermolekül Myloid Differentiation Primary Response Gene 88 (MyD88), welches die Aktivierung der Transforming Growth Factor β-Activated Kinase (TAK)-1-Binding Proteine (TAB)-1, -2 und -3 vermittelt (Broglie et al. 2010), wurde als ein validiertes Zielgen der hsa-miR-155-5p sowie als ein mutmaßliches Zielgen der hsa-miR-30d-5p nachgewiesen. TAB-1 wurde als validiertes Zielgen der hsa-miR-30d-5p, TAB-2 als validiertes Zielgen der hsa-miR-23b-3p sowie hsa-miR-155-5p und TAB-3 als validiertes Zielgen der hsa-miR-23b-3p und mutmaßliches Zielgen der hsa-miR-30d-5p identifiziert. Diese Proteine sind für die Rekrutierung der TAK-1, die den Inhibitor KB Kinase (IKK)-Komplex phosphoryliert, zwingend erforderlich (Broglie et al. 2010). Die Untereinheit IKK- $\beta$  wurde als mutmaßliches Zielgen der hsa-miR-23b-3p und die IKK-y als mutmaßliches Zielgen der hsa-miR-155-5p und hsa-miR-221-5p ermittelt. Beide sind essentielle Komponenten für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (Israël 2010), dessen Untereinheit p50 als validiertes Zielgen der hsa-miR-155-5p identifiziert wurde. Weiterhin wurde der TNFR1, der nach seiner Aktivierung mittels verschiedener Adapterproteine den IKK-Komplex und so den Transkriptionsfaktor NFKB aktiviert (Broglie et al. 2010), als mutmaßliches Zielgen von hsa-miR-29a-3p und hsa-miR-29b-3p identifiziert. TAK-1 und IKK bewirken zudem eine Aktivierung von MAP-Kinasen, wie p $38-\alpha$  (Israël 2010; Simon 2013), ein validiertes Zielgen der hsa-miR-155-5p und mutmaßliches Zielgen der hsa-miR-23b-3p. Ferner wurde die JNK-1 als validiertes Zielgen der hsa-miR-30d-5p und die JNK-3 als mutmaßliches Zielgen der hsa-miR-155-5p identifiziert. Das FOS Proto-Onkogen, ein Substrat der MAP-Kinasen (Simon 2013), wurde als validiertes Zielgen der hsa-miR-29a/b-3p und der hsa-miR-155-5p ermittelt. Als validierte Zielgene der hsa-miR-155-5p wurden die Transkriptionsfaktoren JUN und Jun-B Proto-Oncogene (JUNB) eruiert.

Zahlreiche Zielgene der verändert exprimierten miRNAs sind mit dem Prozess der Apoptose assoziiert. Das Adapterprotein Fas-Associated Death Domain (FADD), welches nach Aktivierung des TNFR1 die Zell-Apoptose induziert (Müller-Esterl 2018b), wurde als validiertes Zielgen der hsa-miR-155-5p identifiziert. Ferner wurde die Caspase-8 als ein validiertes Zielgen von hsa-miR-29a-3p und hsa-miR-29b-3p, die Caspase-3 als ein validiertes Zielgen der hsa-miR-30d-5p und die Caspase-9 als ein mutmaßliches Zielgen der hsa-miR-155-5p und hsa-miR-221-5p ermittelt. Von den anti-apoptotischen BCL-2-Proteinen wurden als Zielgene verändert exprimierter miRNAs identifiziert: BCL-2 (validiertes Zielgen von hsa-miR-29a-3p und hsa-miR-29b-3p), BCL2L1 (validiertes Zielgen von hsa-miR-23b-3p), BCL2L2 (validiertes Zielgen von hsa-miR-221-5p) sowie BCL2L11 (mutmaßliches Zielgen von hsa-miR-221-5p). Auch die proapoptotischen BCL-2-Proteine wurden als Zielgene ermittelt: BCL-2 Antagonist/Killer-1 (BAK-1; validiertes Zielgen von hsa-miR-221-5p und mutmaßliches Zielgen von hsa-miR-29a-3p und hsa-miR-29b-3p), BCL-2 Associated Agonist Of Cell Death (BAD; mutmaßliches Zielgen von hsa-miR-221-5p) sowie der BH3-Interacting Domain Death Agonist (BID; mutmaßliches Zielgen von hsa-miR-30d-5p). Abbildung 11 stellt in einer Übersicht die miRNA-Zielgen-Interaktionen dar, die den IL-1- und TNF-Signalweg, die MAP-Kinasen und die Apoptose-Induktion betreffen.



Abbildung 11) Zielgene validierter humaner miRNAs: IL-1-, TNF-, MAPK-Signalweg, Apoptose.

Zu den identifizierten Zielgenen, die das inflammatorische Potential einer Endothelzelle beeinflussen, gehören das ICAM-1 und das VCAM-1. Die Zelladhäsionsmoleküle spielen bei der Leukozytenadhäsion und -migration eine entscheidende Rolle (Bloos et al. 2007) und wurden als validierte Zielgene von hsa-miR-155-5p identifiziert bzw. VCAM-1 ebenfalls von hsa-miR-23b-3p. Zudem wurde der anti-koagulatorisch wirkende Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) (Tinholt et al. 2015) als validiertes Zielgen der hsa-miR-155-5p ermittelt. Die eNOS wurde als validiertes Zielgen von hsa-miR-155-5p und die iNOS als mutmaßliches Zielgen von hsa-miR-29a-3p und hsa-miR-29b-3p eruiert. Die Caspase-1, ein Interleukin-1 Converting Enzyme, welches die Vorläufer von IL-1 aktiviert (Werdan et al. 2016), gilt als mutmaßliches Zielgen von hsa-miR-30d-5p. Die pro-inflammatorischen Zytokine INF-γ, ein validiertes Zielgen der hsa-miR-29b-3p und ein mutmaßliches Zielgen von miR-23b-3p, und IL-6, ein validiertes Zielgen von hsa-miR-155-5p, wurden ebenfalls identifiziert.

Ferner wurden die vasoaktiven Rezeptoren der Endothelzellen als Zielgene der verändert exprimierten miRNAs ermittelt. Hierzu zählen der vasokonstriktiv wirkende Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AGTR1) (M. Godin und S.G. Ferguson 2012), ein validiertes Zielgen von miR-155-5p, der vasodilatatorisch wirkende AGTR2 (Danyel et al. 2013), ein mutmaßliches Zielgen von hsa-miR-221-5p, der vasokonstriktiv wirkende Arginin Vasopressin Rezeptor-1A (AVPR1A) (Rastorguev et al. 2017), ein validiertes Zielgen von hsa-miR-221-5p, die vasokonstriktiv wirkenden Adrenorezeptoren Alpha-1A (ADRA1A; mutmaßliches Zielgen von hsa-miR-155-5p), Alpha-1B (ADRA1B; mutmaßliches Zielgen von hsa-miR-221-5p) und Alpha-1D (ADRA1D; mutmaßliches Zielgen der hsa-miR-30d-5p) (Mendez et al. 2006) sowie der vasokonstriktiv wirkende Endothelin (ET)-A-Rezeptor (Skovsted et al. 2015), ein mutmaßliches Zielgen von hsa-miR-30d-5p und hsa-miR-221-5p, und der vasodilatatorisch wirkende ET-B-Rezeptor (Skovsted et al. 2015), ein mutmaßliches Zielgen von hsa-miR-23b-3p. Weiterhin wurde das Angiotensin II Typ I Rezeptor-assoziierte Protein (AGTRAP), welches mit dem AGTR1 interagiert und bei der Aktivierung der Signaltransduktion beteiligt ist (Tamura et al. 2013), als validiertes Zielgen von hsa-miR-155-5p und miR-221-5p identifiziert. Eine Übersicht der Interaktionen von Zytokin-induziert verändert exprimierten miRNAs und den zellulären Rezeptoren der Vasomotion ist in Abbildung 12 dargestellt.



Abbildung 12) Zielgene validierter humaner miRNAs: vasoaktive Rezeptoren.

### 5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, verändert exprimierte miRNAs zu identifizieren und zu validieren. Dazu wurden aortales Gewebe septischer Mäuse, LPS-stimulierte Monozyten/Makrophagen (murine Zelllinie RAW264.7) sowie Zytokin-stimulierte Endothelzellen (humane Zelllinie TIME) einem zweifachen Screening nach verändert exprimierten miRNAs unterzogen. Es wurde zum einen das NGS-Verfahren und zum anderen die NanoString-Technologie genutzt, um geeignete miRNAs als Kandidaten für eine fortführende Untersuchung mittels ddPCR zu identifizieren. Validierte miRNAs wurden *in silico* auf Sepsis-assoziierte Zielgene geprüft, um putative Wirkmechanismen dieser miRNAs im Rahmen der Pathophysiologie einer Sepsis in den untersuchten Zelltypen aufzuzeigen.

Der präzise quantitative Nachweis von miRNAs gilt aufgrund der Biologie der kleinen Ribonukleinsäuren als kritisch, wodurch den verwendeten Untersuchungsverfahren und Normalisierungsmethoden eine entscheidende Rolle zukommen (Mestdagh et al. 2014). Die NGS-basierte Analyse ermöglicht alle in einer Probe vorliegenden miRNAs zu detektieren (Luthra et al. 2015), wohingegen Hybridisierungsmethoden, wie die NanoString-Technologie, nur die bereits in miRBase hinterlegten miRNA-Sequenzen detektieren können (Foye et al. 2017). Eine aktuelle Gegenüberstellung der NGS-Technologie und des genutzten NanoString-Panels bezüglich Sensibilität und Sensitivität gibt es nicht. Vergleiche aus dem Jahr 2014 von Tam et al. sowie von Mestdagh et al. ergaben für das vormalige NanoString-Panel, nCounter Human v2 miRNA Expression Assay, im Vergleich zur NGS-Methodik eine geringere Sensitivität und schlechtere Reproduzierbarkeit bei ebenbürtiger Spezifität und Genauigkeit der Ergebnisse (Tam et al. 2014; Mestdagh et al. 2014). Die vorliegende Arbeit lässt keine neuen Aussagen im Hinblick auf Sensitivität oder Spezifität der verwendeten Screening-Methoden zu, da dafür die Anzahl der mittels ddPCR validierten miRNAs zu gering ist. Auffallend waren Unterschiede hinsichtlich der durch die beiden genutzten Screening-Verfahren indizierten Abundanz der detektierten miRNAs. Mehrheitlich zeigte die NGS-Untersuchung höhere Read-Zahlen als das NanoString-Verfahren an (im Mittel um den Faktor 2 bis 5 erhöht). Eine ähnliche Beobachtung machten auch Mestdagh et al. (Mestdagh et al. 2014). Der Vergleich der Screening-Daten mit den Ergebnissen der ddPCR-basierten Validierung ausgewählter miRNAs erbringt mit Blick auf die Vorhersagekraft der im Screening ermittelten Abundanz ein gemischtes Bild. Die Zuverlässigkeit der indizierten Abundanz erwies sich je nach betrachteter miRNA als sehr variabel, wobei keine der genutzten Screening-Techniken dem anderen Verfahren überlegen war.

46

Der Auswahl der basierend auf den generierten Screening-Daten zu validierenden miRNAs wurden mehrere Kriterien zu Grunde gelegt. Zum einen wurden ausschließlich miRNAs berücksichtigt, die bei beiden eingesetzten Screening-Verfahren als verändert exprimiert detektiert worden waren. Mit dieser Verfahrensweise sollten bereits zu einem frühen Zeitpunkt möglichst viele falsch positive Kandidaten ausgeschlossen werden. Nachteil dieses Vorgehens ist, dass möglicherweise vorschnell interessante miRNAs bei der weiteren Analyse nicht berücksichtigt wurden. Ferner steht hierdurch die Validierung von miRNAs aus, die ausschließlich durch das NGS-Verfahren detektiert werden konnten, da sie nicht Teil des genutzten NanoString-Panels waren. Weiterhin wurden mit der festgelegten Mindestgrenze von >100 Reads ausschließlich potenziell abundante miRNAs berücksichtigt. Hintergrund war die Annahme, dass Expressionsänderungen von miRNAs mit niedriger Abundanz nur von geringer funktioneller Bedeutung sein dürften. Im Sinne einer Beachtung möglichst vieler miRNA-Kandidaten wurde bereits eine minimale Expressionsänderung ≥1,45fach bzw. ≤0,7fach anerkannt. In der Literatur wird bevorzugt die Grenze bei einer 2fachen Expressionsveränderung gezogen (Cobos Jiménez et al. 2014; Li et al. 2018). Allerdings existiert für diese Grenzwertsetzung bisher keine valide Begründung. Eine zu strenge Festlegung der Grenzwerte kann vielmehr dazu führen, bedeutende miRNAs vorzeitig auszuschließen. Dies zeigt sich u.a. daran, dass bei der Mehrheit, der in der vorliegenden Arbeit erfolgreich validierten miRNAs im Screening lediglich eine Expressionsveränderung unterhalb eines Grenzwertes von 2 vorlag. Ein abschließendes Kriterium für die Auswahl der zu validierenden miRNAs war zudem das im Rahmen einer in silico-Analyse ermittelte Vorliegen Sepsis-assoziierter Zielgene. Daher können in der vorliegenden Arbeit keine Aussagen getroffen werden bezüglich miRNAs, die zwar im Screening hinsichtlich Expressionsrate herausragten, denen aber nach aktuellem Stand der miRNA-spezifischen Datenbanken keine immunologische Bedeutung zugeordnet werden konnte.

Die Durchführung eines doppelten Screenings unter Verwendung zweier methodisch unterschiedlicher Verfahren ist in der Literatur nur selten beschrieben (Pfeiffer et al. 2017). Diese Vorgehensweise erleichtert aber die Filterung der beim Screening generierten großen Datenmengen und bietet eine elegante Möglichkeit zur Identifizierung von differenziell exprimierten miRNA-Validierungskandidaten. Nachteilig sind der vermehrte finanzielle und experimentelle Aufwand.

Interessant für zukünftige Untersuchungen sind die Screening-Daten zudem hinsichtlich stabil exprimierter miRNAs (≥0,95 ≤1,05). Diese stellen eine Grundlage für die Identifizierung von

47

Referenz-miRNAs dar, die als Housekeeper bei der Durchführung klassischer Real-Time-PCR-Untersuchungen von Nutzen sein könnten.

Die Hoffnung auf eine durch das doppelte Screening deutlich erhöhte Validierungsrate erfüllte sich nicht. Die Validierungsraten betrugen beim aortalen Gewebe septischer Mäuse 0 %, bei der Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 78 % und bei der Endothelzelllinie TIME 46 %. In der Literatur finden sich nur unzureichende Angaben bezüglich zu erwartender Validierungsraten. Die miRQC-Studie von Mestdagh et al. gibt eine durchschnittliche Validierungsrate von 54,6 % an (Mestdagh et al. 2014). Die Rücksprache mit Kollegen anderer Arbeitsgruppen ergab, dass in der experimentellen Praxis häufig maximal 50 % der ursprünglich durch das (einfache) Screening identifizierten miRNA-Kandidaten erfolgreich validiert werden können. Aus dem Vergleich dieser Angaben mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Validierungsraten ergibt sich, dass das doppelte Screening keine grundsätzlich verbesserten Ergebnisse nach sich zieht. Mit Blick auf die Kosten und den Arbeitsaufwand ist ein doppeltes Screening deshalb nicht regelhaft zu empfehlen.

Für die Validierung von miRNA-Expressionsveränderung wird klassischerweise die quantitative Real-Time-PCR genutzt. Dieses Verfahren erfordert zur Quantifizierung der detektierten miRNAs eine Normalisierung basierend auf einer zuverlässigen Referenz. Hierfür gibt es verschiedene Ansätze: kleine nukleäre RNAs, externe Spike-in Oligonukleotide, Normalisierungsfaktoren, wie die mittlere errechnete Expressionsveränderung aller Analyten, oder miRNAs, deren Expression bekanntermaßen nicht der Beeinflussung des zu untersuchenden Stimulus unterliegt (Mestdagh et al. 2009). Jeder dieser Ansätze weist Schwachstellen auf, die die verlässliche Quantifizierung von Real-Time-PCR-Ergebnissen erschwert. So sind für U6, eine häufig zur Normalisierung eingesetzte kleine nukleäre RNA, in Geweben unterschiedlicher Individuen variierende Expressionsraten nachgewiesen worden (Xiang et al. 2014; Benz et al. 2016; Correia et al. 2017). Zudem schwankt die Expression von U6 unter inflammatorischen Bedingungen (Xiang et al. 2014; Correia et al. 2017). Externe Spike-in Oligonukleotide wiederum kontrollieren zwar zuverlässig die cDNA-Synthese, können aber keine Aussage zur Qualität der RNA-Extraktion machen, da sie erst nach der RNA-Extraktion hinzugegeben werden. Normalisierungen basierend auf der mittleren berechneten Expressionsänderung liefern nur beim Vorliegen großer Datenmengen von simultan untersuchten miRNAs zuverlässige Werte. Diese Bedingung ist bei der Mehrzahl der Real-Time-PCR-Untersuchungen nicht gegeben. Eine validierte Referenz-miRNA steht bei Sepsis-Studien bislang nicht zur Verfügung, da zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine miRNA beschrieben wurde, welche durch ein septisches Milieu nicht in ihrer Expression beeinflusst ist (Correia et al. 2017) (Correia et al. 2017). Eine vielversprechende

Alternative stellt die ddPCR dar, die auf einer Tröpfchen-basierten Mikrofluidik-Technologie beruht und basierend auf dem Poisson-Algorithmus die Konzentration der eingesetzten ProbencDNA errechnet (Gürtler und Gerdes 2014). Hierdurch wird eine Referenz-unabhängige absolute Quantifizierung erreicht bei im Vergleich zur klassischen Real-Time-PCR gleichbleibender Sensitivität und Spezifität (Campomenosi et al. 2016). Zudem scheint die ddPCR weniger anfällig für Inhibitoren bei der Amplifizierung zu sein (Hindson et al. 2013). Als nachteilig ist der erhöhte Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand anzusehen. Im Sinne einer hohen Zuverlässigkeit der generierten Daten wurden in der vorliegenden Arbeit für die ddPCR-Analysen validierte miRCURY LNA<sup>™</sup> Universal RT microRNA PCR LNA<sup>™</sup> PCR Primer der Firma Exigon nach etabliertem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Neben der obligaten Negativkontrolle wurde zur Absicherung der Daten überdies eine Spike-in-Kontrolle (UniSp6) mitgeführt. Es ist daher von einer hohen Validität der durchgeführten ddPCR-Analyse auszugehen. Nichtsdestotrotz bedingt die Sensitivitätsgrenze des Verfahrens für die erfolgreiche Detektion einer miRNA eine Mindestzahl exprimierter Kopien der betreffenden Nukleinsäure. Diese wurde durch die miRNAs mmu-miR-200c-3p (aortales Gewebe) und hsa-miR-21-5p (Endothelzelllinie TIME) nicht erreicht, so dass für diese miRNAs keine Aussage bezüglich des potenziellen Einflusses eines inflammatorischen Milieus auf die Expressionsrate getroffen werden kann.

Die ddPCR-Untersuchungen erbrachten für die Aorten septischer Mäuse keine signifikante Expressionsveränderung der untersuchten miRNAs mmu-miR-15b-5p, mmu-miR-132-3p und mmu-miR-144-3p. Auffallend war eine große Streuung der Messdaten speziell bei mmu-miR-15b-5p und mmu-miR-144-3p. Dies könnte darin begründet sein, dass das analysierte aortale Gewebe aus einem Zellgemisch aus glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Fettzellen besteht. Hierdurch kann eine miRNA-Expressionsveränderung in den dominierend vorliegenden glatten Gefäßmuskelzellen durch eine unveränderte Expression oder potenziell gegenläufige Expressionsveränderung in den Endothelzellen, Fibroblasten bzw. Fettzellen maskiert werden. Weiterhin ist fraglich, inwiefern die großen Gefäße durch ein septisches Geschehen beeinflusst werden und ob sich diesbezüglich kleinere Gefäße, wie z. B. Widerstandsgefäße besser als Untersuchungsmaterial eignen. Als einschränkend erweist sich hierbei die murine Anatomie, da sich die Widerstandsgefäße einer Maus nicht ohne beträchtlichen Präparationsaufwand isolieren lassen. In der Literatur finden sich keine Daten zu bereits gelungenen Nachweisen von Expressionsveränderungen hinsichtlich der in der vorliegenden Arbeit untersuchten miRNAs. Hingegen diskutieren Chu et al. eine Expressionsänderung der miRNA mmu-miR-126a-3p in Aorten von LPS-behandelten C57BL/6-Mäusen (Chu et al. 2016). Diese Daten sind aber als fragwürdig einzustufen, da für die relative

49

Quantifizierung der Real-Time-PCR-Ergebnisse U6 als Referenz verwendet wurde, deren Eignung als Referenz unter inflammatorischen Bedingungen strittig ist (Xiang et al. 2014; Corral-Vazquez et al. 2017; Correia et al. 2017; Correia et al. 2017). Für eine abschließende Einschätzung der Rolle von mmu-miR-126a-3p wäre daher eine ddPCR-basierte Analyse erforderlich.

Die ddPCR-Untersuchung der Monozyten/Makrophagen Zelllinie RAW264.7 ergab für 7 der 9 analysierten miRNAs signifikante Expressionsveränderungen. Hierbei bewirkte die LPS-Behandlung der Zellen durchweg eine Verminderung der Expressionsrate. Dies stimmt mit Literaturdaten überein, die für die miRNAs mmu-miR-16, mmu-miR-93 sowie mmu-miR-221-3p ebenfalls eine verminderte Expression in Folge einer LPS-Behandlung von Monozyten/Makrophagen beschreiben (Xu et al. 2014; Ortega et al. 2015; Talari et al. 2015). In den bisherigen Studien wurde eine Real-Time-PCR in Kombination mit U6 als Referenz genutzt. Mit Blick auf die fragliche Eignung von U6 zur Normalisierung von Real-Time-Daten LPSstimulierter Monozyten/Makrophagen liefert die vorliegende Arbeit damit einen endgültigen Beweis für die Modulierbarkeit von mmu-miR-16, mmu-miR-93 und mmu-miR-221-3p unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Auch für mmu-miR-9 und mmu-miR-27b wurden bereits signifikante Änderungen der Expressionsrate bei M1-Makrophagen im Vergleich zu M0-Zellen beschrieben (Lu et al. 2016; Li et al. 2015; Jennewein et al. 2010). Im Gegensatz zur der in der vorliegenden Arbeit detektierten verminderten Expression beobachteten Jennewein et al., Li et al. und Lu et al. allerdings eine gesteigerte Expression. Zu berücksichtigen ist, dass sich diese Studien von der vorliegenden Arbeit hinsichtlich Inkubationszeit (4h vs. 24h) (Lu et al. 2016; Li et al. 2015) bzw. der Art des Stimulus (nur LPS vs. LPS+INF-γ) (Li et al. 2015; Jennewein et al. 2010) unterscheiden. Hierin könnten die abweichenden Messergebnisse begründet sein. Als Referenz verwendeten Lu et al. eine Normalisierung mittels Deseq unter Beachtung von 507 untersuchten miRNAs (Lu et al. 2016), die in diesem Umfang als zuverlässige Normalisierungsmethode anzusehen ist. Li et al. nutzten zur Normalisierung der Ergebnisse die 75. Perzentile der Signalintensität (Li et al. 2015), ein Verfahren, welches aufgrund geringer Variationen als streng eingeordnet wird (Suo et al. 2010). Jennewein et al. wiederum verwendeten als Referenz die ribosomale RNA 18 S, Actin und U6 (Jennewein et al. 2010), welche nicht als zuverlässig gelten. Hervorzuheben ist, dass in der wissenschaftlichen Literatur bislang keine Untersuchungen bezüglich einer LPS-induzierten Expressionsveränderung der miRNAs mmu-miR-15b-5p und mmu-miR-106b-5p bei Monozyten/Makrophagen existiert. Die vorliegende Arbeit liefert somit erstmalig den Beweis einer signifikanten Verminderung der Expressionsrate dieser miRNAs unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Mit Blick auf die hohe Abundanz der miRNAs ist zudem von einer großen physiologischen Relevanz der Daten

auszugehen. Die benannten miRNAs sind daher als ideale Kandidaten für weiterführende Untersuchungen anzusehen.

Bei den mit pro-inflammatorischen Zytokinen stimulierten Endothelzellen der Zelllinie TIME wurden mittels ddPCR bei 6 der 13 untersuchten miRNAs signifikante Expressionsveränderung nachgewiesen. Hierbei waren die miRNAs hsa-miR-23b-3p und hsa-miR-30d-5p durch eine Expression, die miRNAs hsa-miR-29a-3p, signifikant verminderte hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-155-5p und hsa-miR-221-5p hingegen durch eine signifikant gesteigerte Expression gekennzeichnet. In Übereinstimmung mit den Befunden der vorliegenden Arbeit beschrieben Yee et al. und Duan et al. eine deutliche Steigerung der Expressionsrate von hsa-miR-155-5p in Folge einer Zytokin-Stimulation von Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells (HDLEC) (Yee et al. 2017) bzw. HUVECs (Duan et al. 2016). Hierbei ist zu beachten, dass die Art und die Dosierung der verwendeten Zytokine von dem der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Stimulationsschema abweichen (Yee et al. 2017). Die gesteigerte Expression der hsa-miR-155-5p scheint daher ein grundlegender Effekt pro-inflammatorischer Mediatoren auf Endothelzellen zu sein. Zudem wurde in der wissenschaftlichen Literatur eine gesteigerte Expression der hsa-miR-221 in HUVECs, die zusammen mit LPS-stimulierten Makrophagen kultiviert wurden, nachgewiesen (Talepoor et al. 2017). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorgestellten Untersuchung. Auch für die hsa-miR-29b wurde durch Yuan et al. eine gesteigerten Expression durch HUVECs und Eahy926-Zellen nach LPS-Stimulation nachgewiesen (Yuan et al. 2018). Bezüglich der miRNAs hsa-miR-23b-3p, miR-29a-3p und hsa-miR-30d-5p liegen in der wissenschaftlichen Literatur bislang keine Daten vor. Die (mit Ausnahme der hsa-miR-221-5p) gemessene hohe Abundanz dieser miRNAs lässt allerdings eine physiologische Relevanz der beobachteten signifikanten große Änderungen der Expressionsraten erwarten. Die vorliegenden Daten liefern somit eine gute Voraussetzung für vielversprechende weiterführende Untersuchungen. Im Gegensatz zu den vorgenannten miRNAs konnten für hsa-miR-26-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-181a-5p und hsa-miR-181b-5p keine signifikanten Effekte einer Zytokin-Stimulation festgestellt werden, was z. T. auch auf eine breite Streuung der Messdaten zurückzuführen war. In der Literatur finden sich Studien, die eine signifikante Steigerung von hsa-miR-146a-5p und eine signifikante Verminderung von hsa-miR-106-5p bei Zytokin-behandelten Endothelzellen beschreiben. Diese Studien unterscheiden sich von der vorliegenden Arbeit in der Art der verwendeten Zytokine. Zudem wurden die Mediatoren in deutlich höheren Konzentrationen eingesetzt (Cheng et al. 2013a; Yee et al. 2017; Zhang et al. 2016), wodurch die Vergleichbarkeit der Daten eingeschränkt wird. Als Referenz wurde in diesen Studien U6 verwendet (Cheng et al.

2013b; Zhang et al. 2016), dessen Zuverlässigkeit als Housekeeper in einem septischen Milieu fraglich ist (Benz et al. 2016; Marabita et al. 2016). Die Rolle von hsa-miR-106-5p und hsa-miR-146a-5p bei entzündlichen Prozessen des Endothels sollte daher in zukünftigen Untersuchungen abschließend analysiert werden.

Zur Identifizierung validierter wie auch putativer Zielgene der nachweislich verändert exprimierten miRNAs sowie der Zuordnung dieser Zielgene zu gehäuft auftretenden GO-Begriffen wurden die Datenbanken miRWalk2.0 und GOrilla genutzt. Die Datenbank miRWalk2.0 sammelt umfassend Daten über miRNA-Zielgen-Interaktionen (Dweep und Gretz 2015). Bereitgestellt werden zum einen Informationen über bereits experimentell bestätigte Wechselwirkungen zwischen einer bestimmten miRNA und einem bestimmten Gen. Zum anderen erfolgt eine Vorhersage putativer Zielgene basierend auf einem speziell entwickelten Algorithmus, dessen Ergebnisse zusammen mit Daten anderer Datenbanken, wie DianamicroT4, Diana-micro-CD5, miRBridge, miRDB, miRMap, miRNAMap, Pictar2 und RNA22 angezeigt werden (Dweep und Gretz 2015). Die Datenbank GOrilla liefert einen Überblick über die Häufung von GO-Begriffen in einer vorgegebenen Gen-Liste mit Hilfe des mHG-Test. Grundvoraussetzung hierfür ist eine bereits stattgehabte Zuordnung der untersuchten Gene zu einem oder mehreren GO-Begriff(en). GOrilla zeichnet sich durch eine sehr kurze Verarbeitungszeit, eine einfache Handhabung sowie eine übersichtliche Visualisierung der Ergebnisse in Baumdiagrammen aus (Eden et al. 2009).

Die miRWalk2.0-Analyse der untersuchten murinen miRNAs erbrachte, bis auf eine Ausnahme, nur eine geringe Anzahl bereits validierter Zielgene (24 bis 41 Treffer). Einzig die mmu-miR-9-5p erwies sich mit 522 eingetragenen miRNA-Zielgen-Interaktionen als eingehender erforscht. Im Gegensatz hierzu war die Zahl nachweislich validierter Zielgene der untersuchten humanen miRNAs deutlich höher (115 bis 886 Treffer). Dies unterstreicht die besondere Popularität humaner miRNAs in der der biomedizinischen Forschung. Erwartungsgemäß ergaben sich miRNAs in der Zahl identifizierter putativer Zielgene keine Unterschiede zwischen den untersuchten murinen und humanen. Die Vorhersage von mutmaßlichen Zielgenen basiert auf der Übereinstimmung der Basenpaarung zwischen miRNA und mRNA, der thermodynamischen Stabilität einer Interaktion sowie Sequenzanalogien innerhalb von verschiedenen Spezies (Dweep et al. 2013). Die Identifizierung mutmaßlicher Zielgene liefert einen Hinweis auf potenziell bedeutsame Angriffspunkte der miRNAs, doch kann eine tatsächliche miRNA-Zielgen-Interaktion erst nach stattgehabter laborexperimenteller Validierung mit Sicherheit angenommen werden. Übersichten putativer Zielgene sollten daher als eine Grundlage der Hypothesen-Generierung angesehen werden. In diesem Sinne fokussierte die GOrilla-Analyse der mittels miRWalk2.0 generierten Zielgen-Listen auf die Identifizierung von GO-Begriffen, die im Zusammenhang mit Sepsis-assoziierten Prozessen stehen. Leider ergab sich im Zusammenhang mit den untersuchten murinen miRNAs keine Häufung entsprechender GO-Begriffe. Hier könnte sich die in ihrer Gesamtheit geringe Anzahl identifizierter Zielgene negativ ausgewirkt haben. Im Gegensatz dazu konnte den humanen miRNAs hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-155-5p und hsa-miR-221-5p GO-Begriffe zugeordnet werden, die im Zusammenhang mit der Sepsis-induzierten endothelialen Dysfunktion stehen. So wurden bei der Analyse der mutmaßlichen Zielgene der hsa-miR-30d-5p die GO-Begriffe »Regulation der Gefäßweite« und »α-Adrenozeptor Aktivität« identifiziert, was einen ersten Hinweis auf eine regulative Funktion der hsa-miR-30d-5p bei der Vasomotion im Rahmen einer Sepsis liefert. Und auch die putativen Zielgene der hsa-miR-155-5p ergaben mit den GO-Begriffen »Blutdruckregulation«, »Zellaktivierung in Verbindung mit der Immunantwort« sowie »Zelladhäsion« eine potenzielle Einflussnahme dieser miRNA auf den Blutdruck, die Aktivierung von Endothelzellen und das Entstehen einer endothelialen Dysfunktion. Die mutmaßlichen Zielgene der hsa-miR-221-5p erbrachten eine Häufung des GO-Begriffs »Regulation von Endothelzellmigration in Blutgefäßen«, was eine Beteiligung dieser miRNA im Falle einer potenziellen Regeneration andeutet.

Zur Ermittlung detaillierterer Informationen wurden die mittels miRWalk2.0 erstellten Zielgen-Listen im nächsten Schritt einer händigen Analyse unterzogen. Entsprechend dem Vorgehen bei der GOrilla-basierten Untersuchung wurde der Fokus auf die Identifizierung von Zielgenen gelegt, die bekanntermaßen mit der Sepsis-Pathogenese in Zusammenhang stehen. Hierzu zählten bei den untersuchten murinen miRNAs Zielgene mit Assoziation zur immunologischen Funktion von Monozyten/Makrophagen (u.a. Aktivierung inflammatorischer Signalkaskaden, Expression anti-mikrobieller und pro-inflammatorischer Mediatoren, Apoptose). Analog wurde der Schwerpunkt bei den untersuchten humanen miRNAs auf die Identifizierung von Zielgenen mit Assoziation zur endothelialen Dysfunktion (u.a. Aktivierung inflammatorischer Signalkaskaden, Expression von Zelladhäsionsmolekülen, anti- bzw. pro-koagulatorischen Proteinen, vasoaktiven Rezeptoren, Apoptose) gelegt.

Die händige Analyse der Zielgen-Listen der validierten murinen miRNAs, die in den Monozyten/Makrophagen identifiziert wurden, ergab eine Beteiligung an inflammatorischen Signalkaskaden wie dem klassischen und endosomalen TLR-Signalweg, aber auch der MAP-Kinase-Signalkaskade und der Apoptose. miRNAs beeinflussen die Expression ihrer Zielgene in der Regel negativ. Somit ist bei einer verminderten miRNA-Expression, wie sie in der vorliegenden Arbeit bei allen validierten murinen miRNAs nachgewiesen wurde, von einer vermehrten Expression der identifizierten Zielgene auszugehen. Die beobachteten Expressionsveränderungen der miRNAs sprechen demzufolge für eine verstärkte Synthese von Mediatoren inflammatorischer Signalkaskaden. Die in der wissenschaftlichen Literatur beschriebene Differenzierung von Makrophagen unter LPS-Einfluss zum pro-inflammatorischen M1-Typ wird demzufolge auch durch Änderungen des zellulären miRNA-Profils vermittelt (Essandoh et al. 2016).

Bei der händigen Analyse der mittels der Datenbank miRWalk2.0 identifizierten Zielgene der miRNAs (hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-29a-3p, validierten humanen hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-221-5p) ergaben sich umfangreiche Assoziationen zur endothelialen Dysfunktion. Dies umfasste - im Einklang mit den Daten der durchgeführten GO-Analyse – zum einen die Aktivierung der Endothelzellen im Rahmen inflammatorischer Signalkaskaden und zum anderen die Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen und vasoaktiven Rezeptoren. Die endotheliale Dysfunktion und die Vasoplegie sind entscheidende Faktoren der Sepsis-Pathogenese und stehen in engem Zusammenhang mit den hohen Mortalitätsraten von Sepsispatienten. Die Erforschung der Rolle der identifizierten miRNAs für die ablaufenden Pathomechanismen ist daher als ein vielversprechender Bereich innerhalb der Sepsis-Forschung anzusehen, welcher bisher nur unzureichend beleuchtet wurde. Besonders die miRNAs hsa-miR-30d-5p und hsa-miR-155-5p bieten mit Blick auf die ihre hohe zelluläre Abundanz gute Voraussetzungen für zukünftige Untersuchungen. Dabei zeigten sich bei der ddPCR Untersuchung gegenläufigen Expressionsveränderungen, wobei die hsa-miR-30d-5p sich in ihrer dem inflammatorischen Stimulus nahezu Expression unter halbierte und die hsa-miR-155-5p annähernd verdoppelte. Welche Faktoren dabei eine Rolle spielen und welche Folgen sich aus dieser Expressionsveränderungen für die Funktionalität des Endothels ergeben, gilt es in zukünftigen Studien nachzuvollziehen.

Die vorliegende Arbeit hatte Ziel expressionsveränderte miRNAs in zum entzündungsassoziierten Zellen zu identifizieren und putative Wirkmechanismen zu erstellen. Hierbei gelang es sowohl für die murine Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 als auch für die endotheliale Zelllinie TIME Inflammations-bedingt verändert exprimierte miRNAs zu identifizieren sowie das Ausmaß der Expressionsunterschiede in absoluter Kopienzahl zu quantifizieren. Die erzielten Ergebnisse liefern einen klaren Beleg für die Bedeutung von miRNAs Regulation inflammatorischer Prozesse von Monozyten/Makrophagen und in der Endothelzellen. Hervorzuheben ist, dass eine Reihe der beschriebenen miRNAs erstmalig mit LPS- bzw. Zytokin-vermittelten Prozessen in den untersuchten Zelltypen in Verbindung gebracht wurden. Dies ist z. T. auf den besonderen experimentellen Ansatz zurückzuführen, der ein

umfassendes Screening mit einem verlässlichen Validierungsverfahren kombinierte. Zudem konnte mittels *in silico*-Analyse ein Einblick in die Wirkmechanismen der identifizierten miRNAs gewonnen werden. Herausragend war die Häufung von (bereits validierten) miRNA-Zielgen-Interaktionen, die im Zusammenhang mit der Aktivierung der Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen mittels TLR- und JAK-STAT-Signalweg, der endothelialen Dysfunktion sowie der Apoptose beider untersuchter Zelltypen stehen. Die erzielten Ergebnisse bilden somit eine gute Datengrundlage für weiterführende Untersuchungen.

## 6 Zusammenfassung

Eine Entzündung ist eine körpereigene Reaktion auf eine Gewebeschädigung, die sich bei einer systemischen Ausweitung auf den gesamten Körper zu einer Sepsis aggravieren und daraus resultierend zu Organdysfunktionen bis hin zum Kreislaufversagen führen kann. Dies basiert auf zellulären Prozessen, die u.a. durch eine post-transkriptionelle Regulation der Genexpression beeinflusst werden. Eine wichtige Rolle bei der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression nehmen miRNAs ein, deren Einfluss auf die Pathomechanismen einer Sepsis bisher nur unzureichend untersucht worden ist. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit Aorten septischer Mäuse, LPS-behandelte Monozyten/Makrophagen der Zelllinie RAW264.7 sowie Zytokin-stimulierte Endothelzellen der Zelllinie TIME auf miRNA-Expressionsveränderungen untersucht. Hierzu wurde zunächst ein Screening mittels NGS- und NanoString-Technologie durchgeführt. Identifizierte miRNA-Kandidaten wurden einer Validierung mittels ddPCR unterzogen. Es folgte eine *in silico*-Analyse unter Einsatz der Datenbanken miRWalk und GOrilla mit dem Ziel die Zielgene und damit einhergehend die putativen Wirkmechanismen der nachweislich verändert exprimierten miRNAs zu beschreiben.

Basierend auf den erzielten Screening-Daten wurden für die Aorten septischer Mäuse 4 miRNAs, für die LPS-behandelten Monozyten/Makrophagen 9 miRNAs und für die Zytokin-stimulierten Endothelzellen 13 miRNAs als Validierungs-Kandidaten ausgewählt, da sie in beiden genutzten Screening-Verfahren als gleichgerichtet verändert exprimiert detektiert wurden sowie Assoziationen zu Sepsis-assoziierten Zielgenen aufwiesen. Die Validierung dieser miRNAs mittels ddPCR war bei Untersuchung von Aorten septischer Mäuse in keinem Fall, bei Untersuchung LPS-behandelter Monozyten/Makrophagen in 7 Fällen und bei Untersuchung Zytokinstimulierter Endothelzellen in 6 Fällen erfolgreich.

Die anschließende *in silico*-Analyse der nachweislich verändert exprimierten miRNAs ergab für die Monozyten/Makrophagen Interaktionen mit dem klassischen und endosomalen TLR-Signalweg, der MAP-Kinase-Signalkaskade sowie der Apoptose. Die in Folge einer LPS-Behandlung der Monozyten/Makrophagen vermindert exprimierten miRNAs mmu-miR-9-5p, mmu-miR-15b-5p, mmu-miR-16-5p, mmu-miR-27b-3p, mmu-miR-93-4p, mmu-miR-106b-5p und mmu-miR-221-3p nehmen demzufolge Einfluss auf das inflammatorische Potential der Immunzellen. Dies macht eine miRNA-basierte Beeinflussung der Makrophagen-Polarisation wahrscheinlich. Die *in silico*-Analyse der bei den Endothelzellen nachweislich verändert exprimierten miRNAs hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-155-5p und hsa-miR-221-5p indizierte Interaktionen mit dem JAK-STAT-, IL-1-, TNF- und

56

MAP-Kinase-Signalweg sowie der Apoptose. Zudem konnten Assoziationen zur endothelialen Dysfunktion und der Expression vasoaktiver Rezeptoren identifiziert werden, welche im Zusammenhang mit der Entstehung eines septischen Kreislaufversagens eingehender untersucht werden sollten.

#### 7 Literaturverzeichnis

Backes (2018) miRCarta; A central repository for collecting miRNA candidates. Nucleic acids research 46:D160-D167. doi:10.1093/nar/gkx851

Baker (2010) MicroRNA profiling; Separating signal from noise. Nature methods 7:687–692. doi:10.1038/nmeth0910-687

Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T (2016) Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. International journal of molecular sciences 17. doi:10.3390/ijms17010078

Bloos F, Bauer M, Reinhart K (2007) Pathophysiologie der Sepsis und des Multiorganversagens. In: van Aken H (Hrsg) Intensivmedizin. Thieme, Stuttgart u.a., S 831–842

Broglie P, Matsumoto K, Akira S, Brautigan DL, Ninomiya-Tsuji J (2010) Transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) kinase adaptor, TAK1-binding protein 2, plays dual roles in TAK1 signaling by recruiting both an activator and an inhibitor of TAK1 kinase in tumor necrosis factor signaling pathway. The Journal of biological chemistry 285:2333–2339. doi:10.1074/jbc.M109.090522

Brunkhorst FM, Schmitz RPH (2016a) Definition, Epidemiologie und ökonomische Aspekte der Sepsis; Epidemiologie der Sepsis in Deutschland. In: Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM (Hrsg) Sepsis und MODS. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 10–14

Brunkhorst FM, Schmitz RPH (2016b) Diagnose der Infektion und Stellenwert von Biomarkern. In: Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM (Hrsg) Sepsis und MODS. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 17–38

Bührke A, Bär C, Thum T (2017) Nichtkodierende RNA; Innovative Regulatoren mit therapeutischer Perspektive. Herz. doi:10.1007/s00059-017-4660-4

Burgdorff A-M, Bucher M, Schumann J (2018) Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock; Pathways and mechanisms. The Journal of international medical research:300060517743836. doi:10.1177/0300060517743836

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

Carroll AP, Goodall GJ, Liu B (2014) Understanding principles of miRNA target recognition and function through integrated biological and bioinformatics approaches. Wiley interdisciplinary reviews. RNA 5:361–379. doi:10.1002/wrna.1217

Chatterjee V, Beard RS, Reynolds JJ, Haines R, Guo M, Rubin M, Guido J, Wu MH, Yuan SY (2014) MicroRNA-147b regulates vascular endothelial barrier function by targeting ADAM15 expression. PloS one 9:e110286. doi:10.1371/journal.pone.0110286

Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, Delgado-Olguin P, Cybulsky MI, Fish JE (2013a) MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting proinflammatory pathways. EMBO molecular medicine 5:1017–1034. doi:10.1002/emmm.201202318

Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, Delgado-Olguin P, Cybulsky MI, Fish JE (2013b) MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting proinflammatory pathways. EMBO molecular medicine 5:1017–1034. doi:10.1002/emmm.201202318

Chu M, Qin S, Wu R, Zhou X, Tang X, Zhang S, Zhao Q, Wang H, Liu Y, Han X, Xiao J, Li X, Zhang C (2016) Role of MiR-126a-3p in Endothelial Injury in Endotoxic Mice. Critical care medicine 44:e639-e650. doi:10.1097/CCM.000000000001629

Cobos Jiménez V, Bradley EJ, Willemsen AM, van Kampen AHC, Baas F, Kootstra NA (2014) Nextgeneration sequencing of microRNAs uncovers expression signatures in polarized macrophages. Physiological genomics 46:91–103. doi:10.1152/physiolgenomics.00140.2013

Corral-Vazquez C, Blanco J, Salas-Huetos A, Vidal F, Anton E (2017) Normalization matters; Tracking the best strategy for sperm miRNA quantification. Molecular human reproduction 23:45–53. doi:10.1093/molehr/gaw072

Correia CN, Nalpas NC, McLoughlin KE, Browne JA, Gordon SV, MacHugh DE, Shaughnessy RG (2017) Circulating microRNAs as Potential Biomarkers of Infectious Disease. Frontiers in immunology 8:118. doi:10.3389/fimmu.2017.00118

Dale M, Hammond DW, Cox A, Nicklin MJ (1998) The human gene encoding the interleukin-1 receptor accessory protein (IL1RAP) maps to chromosome 3q28 by fluorescence in situ hybridization and radiation hybrid mapping. Genomics 47:325–326. doi:10.1006/geno.1997.5113

Danyel LA, Schmerler P, Paulis L, Unger T, Steckelings UM (2013) Impact of AT2-receptor stimulation on vascular biology, kidney function, and blood pressure. Integrated blood pressure control 6:153–161. doi:10.2147/IBPC.S34425

Dempfle C-E (2016) Hämostasestörungen – Diagnostik und Therapie; Disseminierte intravasale Gerinnung (DIC). In: Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM (Hrsg) Sepsis und MODS. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 205–209

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

Dharap A, Pokrzywa C, Murali S, Pandi G, Vemuganti R (2013) MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. PloS one 8:e79467. doi:10.1371/journal.pone.0079467

Djebali S, Davis CA, Merkel A et al (2012) Landscape of transcription in human cells. Nature 489:101–108. doi:10.1038/nature11233

Duan Q, Mao X, Xiao Y, Liu Z, Wang Y, Zhou H, Zhou Z, Cai J, Xia K, Zhu Q, Qi J, Huang H, Plutzky J, Yang T (2016) Super enhancers at the miR-146a and miR-155 genes contribute to self-regulation of inflammation. Biochimica et biophysica acta 1859:564–571. doi:10.1016/j.bbagrm.2016.02.004

Dunne A, Carpenter S, Brikos C, Gray P, Strelow A, Wesche H, Morrice N, O'Neill LAJ (2010) IRAK1 and IRAK4 promote phosphorylation, ubiquitination, and degradation of MyD88 adaptor-like (Mal). The Journal of biological chemistry 285:18276–18282. doi:10.1074/jbc.M109.098137

Dweep H, Gretz N (2015) miRWalk2.0; A comprehensive atlas of microRNA-target interactions. Nature methods 12:697. doi:10.1038/nmeth.3485.

Dweep H, Sticht C, Gretz N (2013) In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. Current Genomics 14:127–136. doi:10.2174/1389202911314020005

Dweep H, Gretz N, Sticht C (2014) miRWalk database for miRNA-target interactions. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 1182:289–305. doi:10.1007/978-1-4939-1062-5\_25.

Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z (2009) GOrilla; A tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. BMC bioinformatics 10:48. doi:10.1186/1471-2105-10-48
Engelmann L, Schuster H-P (Hrsg) (2006) Diagnostik und Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen. Steinkopff, Darmstadt

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.00000000000000604

Fan H, Goodwin AJ, Chang E, Zingarelli B, Borg K, Guan S, Halushka PV, Cook JA (2014) Endothelial progenitor cells and a stromal cell-derived factor- $1\alpha$  analogue synergistically improve survival in sepsis. American journal of respiratory and critical care medicine 189:1509–1519. doi:10.1164/rccm.201312-2163OC

Ferdous T, Ullah MO (2017) An Overview of RNA-seq Data Analysis. JBLS 8:57. doi:10.5296/jbls.v8i2.11255

Fishman C (2010) An Introduction to Illumina's Next Gen Sequencing. https://www.illumina.com/documents/products/illumina\_sequencing\_introduction.pdf. Zugegriffen: 07. August 2019

Floren C, Wiedemann I, Brenig B, Schütz E, Beck J (2015) Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR). Food chemistry 173:1054–1058. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.138

Foye C, Yan IK, David W, Shukla N, Habboush Y, Chase L, Ryland K, Kesari V, Patel T (2017) Comparison of miRNA quantitation by Nanostring in serum and plasma samples. PloS one 12:e0189165. doi:10.1371/journal.pone.0189165

Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome research 19:92–105. doi:10.1101/gr.082701.108

G.-D. Burchard (2016) Fieber - Pathophysiologie und Differentialdiagnosen. In: Suerbaum (Hrsg) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 805–806

Ganten D. RK (Hrsg) (2014) Immunsystem und infektiologie. Springer, S

Gaudet P, Livstone MS, Lewis SE, Thomas PD (2011) Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. Briefings in bioinformatics 12:449–462. doi:10.1093/bib/bbr042

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science (New York, N.Y.) 327:656–661. doi:10.1126/science.1178331

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

Gürtler P, Gerdes L (2014) Digitale Polymerasekettenreaktion (dPCR). Biospektrum 20:632–635. doi:10.1007/s12268-014-0498-y

Hagel S, Forstner C, Welte T, Pletz M (2016) Antimikrobielle Therapie; Einleitung. In: Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM (Hrsg) Sepsis und MODS. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 86

Harris MA, Clark J, Ireland A et al (2004) The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. Nucleic acids research 32:D258-61. doi:10.1093/nar/gkh036

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

Ho J, Chan H, Wong SH, Wang MHT, Yu J, Xiao Z, Liu X, Choi G, Leung CCH, Wong WT, Li Z, Gin T, Chan MTV, Wu WKK (2016) The involvement of regulatory non-coding RNAs in sepsis; A systematic review. Critical care (London, England) 20:383. doi:10.1186/s13054-016-1555-3

Huang T (2011) Next generation sequencing to characterize mitochondrial genomic DNA heteroplasmy. Current protocols in human genetics Chapter 19:Unit19.8. doi:10.1002/0471142905.hg1908s71

Huang J, Sun Z, Yan W, Zhu Y, Lin Y, Chen J, Shen B, Wang J (2014) Identification of microRNA as sepsis biomarker based on miRNAs regulatory network analysis. BioMed research international 2014:594350. doi:10.1155/2014/594350

Huntzinger E, Izaurralde E (2011) Gene silencing by microRNAs; Contributions of translational repression and mRNA decay. Nature reviews. Genetics 12:99–110. doi:10.1038/nrg2936

Ipsaro JJ, Joshua-Tor L (2015) From guide to target; Molecular insights into eukaryotic RNAinterference machinery. Nature structural & molecular biology 22:20–28. doi:10.1038/nsmb.2931

Israël A (2010) The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2:a000158. doi:10.1101/cshperspect.a000158

Janssens U (2016) Langzeitmorbidität, -letalität und Lebensqualität; Komorbiditäten. In: Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM (Hrsg) Sepsis und MODS. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 369

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

Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity; Update on Toll-like receptors. Nature immunology 11:373–384. doi:10.1038/ni.1863

Kazi JU, Kabir NN, Flores-Morales A, Rönnstrand L (2014) SOCS proteins in regulation of receptor tyrosine kinase signaling. Cellular and molecular life sciences : CMLS 71:3297–3310. doi:10.1007/s00018-014-1619-y.

King KR, Aguirre AD, Ye Y-X, Sun Y, Roh JD, Ng RP, Kohler RH, Arlauckas SP, Iwamoto Y, Savol A, Sadreyev RI, Kelly M, Fitzgibbons TP, Fitzgerald KA, Mitchison T, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R (2017) IRF3 and type I interferons fuel a fatal response to myocardial infarction. Nature medicine 23:1481–1487. doi:10.1038/nm.4428

Knippers R (2006) Molekulare Genetik; 68 Tabellen. Thieme, Stuttgart

Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S (2019) miRBase; From microRNA sequences to function. Nucleic acids research 47:D155-D162. doi:10.1093/nar/gky1141

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. Science (New York, N.Y.) 294:858–862. doi:10.1126/science.1065062

Lee YJD, Kim V, Muth DC, Witwer KW (2015) Validated MicroRNA Target Databases; An Evaluation. Drug development research 76:389–396. doi:10.1002/ddr.21278

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

Li JJ, Tay HL, Maltby S, Xiang Y, Eyers F, Hatchwell L, Zhou H, Toop HD, Morris JC, Nair P, Mattes J, Foster PS, Yang M (2015) MicroRNA-9 regulates steroid-resistant airway hyperresponsiveness by reducing protein phosphatase 2A activity. The Journal of allergy and clinical immunology 136:462–473. doi:10.1016/j.jaci.2014.11.044

Lin S, Gregory RI (2015) MicroRNA biogenesis pathways in cancer. Nature reviews. Cancer 15:321–333. doi:10.1038/nrc3932

Liu B, Li J, Cairns MJ (2014) Identifying miRNAs, targets and functions. Briefings in bioinformatics 15:1–19. doi:10.1093/bib/bbs075

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. Scientific reports 6:37446. doi:10.1038/srep37446

Lüllmann-Rauch R (2009) Taschenlehrbuch Histologie; Kreislauforgane. Thieme, Stuttgart, New York, NY

Luthra R, Chen H, Roy-Chowdhuri S, Singh RR (2015) Next-Generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics of Cancer; Advantages and Challenges. Cancers 7:2023–2036. doi:10.3390/cancers7040874

M. Godin C, S.G. Ferguson S (2012) Biased Agonism of the Angiotensin II Type 1 Receptor. MRMC 12:812–816. doi:10.2174/138955712800959134

M'Boutchou M-N, van Kempen LC (2016) Analysis of the Tumor Microenvironment Transcriptome via NanoString mRNA and miRNA Expression Profiling. In: Ursini-Siegel J, Beauchemin N (Hrsg) The tumor microenvironment. Methods and protocols. Humana Press, New York, S 291–295

MacFarlane and Murphy (2010) MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Current Genomics:537–561

Marabita F, Candia P de, Torri A, Tegnér J, Abrignani S, Rossi RL (2016) Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. Briefings in bioinformatics 17:204–212. doi:10.1093/bib/bbv056

Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, Bressan J, Martínez JA, Marti A (2015) Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 29:3595–3611. doi:10.1096/fj.14-260323

Mendez E, Calzada C, Ocharan E, Sierra A, Castillo C, Ramirez I, Meaney E, Meaney A, Asbun J, Miliar A, Herrera J, Ceballos G (2006) Differential expression of alpha1-adrenergic receptor subtypes in coronary microvascular endothelial cells in culture. European journal of pharmacology 546:127–133. doi:10.1016/j.ejphar.2006.06.070 Mestdagh P, van Vlierberghe P, Weer A de, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. Genome biology 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

Moon H-G, Yang J, Zheng Y, Jin Y (2014) miR-15a/16 regulates macrophage phagocytosis after bacterial infection. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 193:4558–4567. doi:10.4049/jimmunol.1401372

Müller-Esterl W (2018a) Angeborenes und erworbenes Immunsystem. In: Müller-Esterl W (Hrsg) Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 515–533

Müller-Esterl W (Hrsg) (2018b) Biochemie; Eine Einführung für Mediziner und Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg

Müller-Esterl W (2018c) Transkription – Umschrift genetischer Information. In: Müller-Esterl W (Hrsg) Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 202–2016

Müller-Esterl W (2018d) Translation - Decodierung genetischer Interaktion. In: Müller-Esterl W (Hrsg) Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 217–232

Müller-Esterl W (2018e) Zellzyklus und programmierter Zelltod. In: Müller-Esterl W (Hrsg) Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 482–492

Müller-Werdan U, Ebelt, Wilhelm Wimmer, Buerke, (2016) J, Werdan Κ Mikrozirkulationsstörung, zytopathische Hypoxie und septische Kardiomyopathie; Mikrozirkulationsstörung. In: Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM (Hrsg) Sepsis und MODS. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 132–134

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

Offermanns S. (2016a) Antiphlogistika und Antiallergika. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (Hrsg) Pharmakologie und Toxikologie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 198-212

Offermanns S. (2016b) Eicosanoide. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (Hrsg) Pharmakologie und Toxikologie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 160–164

Offermanns S. (2016c) Zytokine. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (Hrsg) Pharmakologie und Toxikologie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 180–186

Ola MS, Nawaz M, Ahsan H (2011) Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. Molecular and cellular biochemistry 351:41–58. doi:10.1007/s11010-010-0709-x

Ortega FJ, Moreno M, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Fuentes-Batllevell N, Sabater M, Ricart W, Fernández-Real JM (2015) Inflammation triggers specific microRNA profiles in human adipocytes and macrophages and in their supernatants. Clinical epigenetics 7:49. doi:10.1186/s13148-015-0083-3

Parveen A, Gretz N, Dweep H (2016) Obtaining miRNA-Target Interaction Information from miRWalk2.0. Current protocols in bioinformatics 55:12.15.1-12.15.27. doi:10.1002/cpbi.14.

Pfeiffer D, Roßmanith E, Lang I, Falkenhagen D (2017) miR-146a, miR-146b, and miR-155 increase expression of IL-6 and IL-8 and support HSP10 in an In vitro sepsis model. PloS one 12:e0179850. doi:10.1371/journal.pone.0179850

Prakasam A, Ghose S, Oleinik NV, Bethard JR, Peterson YK, Krupenko NI, Krupenko SA (2014) JNK1/2 regulate Bid by direct phosphorylation at Thr59 in response to ALDH1L1. Cell death & disease 5:e1358. doi:10.1038/cddis.2014.316

Ralf Brandes RB (2011) Kreislauf; Mikrozirkulation. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hrsg) Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 587–592

Rastorguev AS, Utkin ND, Zabolotskikh MV, Dambis AK, Bajkova AT, Bobylev VV (2017) Galactic masers; Kinematics, spiral structure and the disk dynamic state. Astrophys. Bull. 72:122–140. doi:10.1134/S1990341317020043

Richter DC, Heininger A, Brenner T, Hochreiter M, Bernhard M, Briegel J, Dubler S, Grabein B, Hecker A, Kruger WA, Mayer K, Pletz MW, Storzinger D, Pinder N, Hoppe-Tichy T, Weiterer S, Zimmermann S, Brinkmann A, Weigand MA, Lichtenstern C (2018) Bakterielle Sepsis; Diagnostik und kalkulierte Antibiotikatherapie. Der Anaesthesist. doi:10.1007/s00101-017-0396-z

Roderburg C, Luedde M, Vargas Cardenas D, Vucur M, Scholten D, Frey N, Koch A, Trautwein C, Tacke F, Luedde T (2013) Circulating microRNA-150 serum levels predict survival in patients with critical illness and sepsis. PloS one 8:e54612. doi:10.1371/journal.pone.0054612 Schindler C, Levy DE, Decker T (2007) JAK-STAT signaling; From interferons to cytokines. The Journal of biological chemistry 282:20059–20063. doi:10.1074/jbc.R700016200

Schober D (2002) Microarrays, Genexpressionsanalyse und Bioinformatik. Biospektrum 8.:307– 310

Schober A, Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Bidzhekov K, Gremse F, Grommes J, Megens RTA, Heyll K, Noels H, Hristov M, Wang S, Kiessling F, Olson EN, Weber C (2014) MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. Nature medicine 20:368–376. doi:10.1038/nm.3487

Simon (2013) Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. Nature reviews. Immunology 13:679–692. doi:10.1038/nri3495

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 315:801–810. doi:10.1001/jama.2016.0287

Skovsted GF, Kilic S, Edvinsson L (2015) Endothelin-1 and Endothelin-3 Regulate Endothelin Receptor Expression in Rat Coronary Arteries. Basic & clinical pharmacology & toxicology 117:297–305. doi:10.1111/bcpt.12407

Sprenger H, Gemsa D (2014) Angeborene Mechanismen der Infektabwehr. In: Ganten D. RK (Hrsg) Immunsystem und infektiologie. Springer, S, S 317–340

Sun X, Icli B, Wara AK, Belkin N, He S, Kobzik L, Hunninghake GM, Vera MP, Blackwell TS, Baron RM, Feinberg MW (2012) MicroRNA-181b regulates NF-κB-mediated vascular inflammation. The Journal of clinical investigation 122:1973–1990. doi:10.1172/JCI61495

Suo C, Salim A, Chia K-S, Pawitan Y, Calza S (2010) Modified least-variant set normalization for miRNA microarray. RNA (New York, N.Y.) 16:2293–2303. doi:10.1261/rna.2345710

Talari M, Kapadia B, Kain V, Seshadri S, Prajapati B, Rajput P, Misra P, Parsa KVL (2015) MicroRNA-16 modulates macrophage polarization leading to improved insulin sensitivity in myoblasts. Biochimie 119:16–26. doi:10.1016/j.biochi.2015.10.004

Talepoor AG, Kalani M, Dahaghani AS, Doroudchi M (2017) Hydrogen Peroxide and Lipopolysaccharide Differentially Affect the Expression of MicroRNAs 10a, 33a, 21, 221 in Endothelial Cells Before and After Coculture With Monocytes. International journal of toxicology 36:133–141. doi:10.1177/1091581817695270 Tam S, Borja R de, Tsao M-S, McPherson JD (2014) Robust global microRNA expression profiling using next-generation sequencing technologies. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 94:350–358. doi:10.1038/labinvest.2013.157

Tamura K, Wakui H, Maeda A, Dejima T, Ohsawa M, Azushima K, Kanaoka T, Haku S, Uneda K, Masuda S-i, Azuma K, Shigenaga A-i, Koide Y, Tsurumi-Ikeya Y, Matsuda M, Toya Y, Tokita Y, Yamashita A, Umemura S (2013) The Physiology and Pathophysiology of a Novel Angiotensin Receptor-binding Protein ATRAP/Agtrap. CPD 19:3043–3048. doi:10.2174/1381612811319170010

Thornton B, Basu C (2015) Rapid and simple method of qPCR primer design. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 1275:173–179. doi:10.1007/978-1-4939-2365-6\_13.

Thum T, Condorelli G (2015) Long noncoding RNAs and microRNAs in cardiovascular pathophysiology. Circulation research 116:751–762. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303549

Timpson NJ, Greenwood CMT, Soranzo N, Lawson DJ, Richards JB (2017) Genetic architecture; The shape of the genetic contribution to human traits and disease. Nature reviews. Genetics. doi:10.1038/nrg.2017.101

Tinholt M, Stavik B, Louch W, Carlson CR, Sletten M, Ruf W, Skretting G, Sandset PM, Iversen N (2015) Syndecan-3 and TFPI colocalize on the surface of endothelial-, smooth muscle-, and cancer cells. PloS one 10:e0117404. doi:10.1371/journal.pone.0117404

Uhle F, Lichtenstern C, Weigand MA (2016) Pathophysiologie; Das Immunsystem in der Sepsis. In: Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM (Hrsg) Sepsis und MODS. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 40–54

van Rooij E, Olson EN (2012) MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. Nature reviews. Drug discovery 11:860–872. doi:10.1038/nrd3864

Wan Y, Xiao H, Affolter J, Kim TW, Bulek K, Chaudhuri S, Carlson D, Hamilton T, Mazumder B, Stark GR, Thomas J, Li X (2009) Interleukin-1 receptor-associated kinase 2 is critical for lipopolysaccharide-mediated post-transcriptional control. The Journal of biological chemistry 284:10367–10375. doi:10.1074/jbc.M807822200

Wang Z-h, Liang Y-b, Tang H, Chen Z-b, Li Z-y, Hu X-c, Ma Z-f (2013a) Dexamethasone downregulates the expression of microRNA-155 in the livers of septic mice. PloS one 8:e80547. doi:10.1371/journal.pone.0080547 Wang L, Wang HC, Chen C, Zeng J, Wang Q, Zheng L, Yu HD (2013b) Differential expression of plasma miR-146a in sepsis patients compared with non-sepsis-SIRS patients. Experimental and Therapeutic Medicine 5:1101–1104

Wang X, Wang X, Liu X, Xu J, Hou S, Zhang X, Ding Y (2015) miR-15a/16 are upreuglated in the serum of neonatal sepsis patients and inhibit the LPS-induced inflammatory pathway. Int J Clin Exp Med:5683–5690

Wang D, Shi L, Xin W, Xu J, Xu J, Li Q, Xu Z, Wang J, Wang G, Yao W, He B, Yang Y, Hu M (2017) Activation of PPARy inhibits pro-inflammatory cytokines production by upregulation of miR-124 in vitro and in vivo. Biochemical and biophysical research communications 486:726–731. doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.106

Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM (Hrsg) (2016) Sepsis und MODS. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg

Weyland A, Jelschen F (2016) Hämodynamisches Monitoring in der Sepsis; Grundlegende hämodynamische Veränderungen in der Sepsis. In: Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM (Hrsg) Sepsis und MODS. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 102–103

Wittmann J, Jäck H-M, Mashreghi M-F (2011) MicroRNAs in B- und T-Zellen als Regulatoren der Entzündung. Zeitschrift fur Rheumatologie 70:507–510. doi:10.1007/s00393-011-0842-2

Wolfgang Jelkmann (2011a) Blut; Blutstillung und -gerinnung. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hrsg) Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 492–498

Wolfgang Jelkmann (2011b) Blut; Leukozyten. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hrsg) Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 489–491

Wu X-Y, Fan W-D, Fang R, Wu G-F (2014) Regulation of microRNA-155 in endothelial inflammation by targeting nuclear factor (NF)-κB P65. Journal of cellular biochemistry 115:1928–1936. doi:10.1002/jcb.24864

Wu M, Gu J-T, Yi B, Tang Z-Z, Tao G-C (2015) microRNA-23b regulates the expression of inflammatory factors in vascular endothelial cells during sepsis. Experimental and Therapeutic Medicine 9:1125–1132. doi:10.3892/etm.2015.2224

Xiang M, Zeng Y, Yang R, Xu H, Chen Z, Zhong J, Xie H, Xu Y, Zeng X (2014) U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. Biochemical and biophysical research communications 454:210–214. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.064

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

Yang J-S, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, Chen KC, Lai EC (2011) Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA\* species. RNA (New York, N.Y.) 17:312–326. doi:10.1261/rna.2537911

Yee D, Shah KM, Coles MC, Sharp TV, Lagos D (2017) MicroRNA-155 induction via TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  suppresses expression of programmed death ligand-1 (PD-L1) in human primary cells. The Journal of biological chemistry 292:20683–20693. doi:10.1074/jbc.M117.809053

Yuan H, Ma J, Li T, Han X (2018) MiR-29b aggravates lipopolysaccharide-induced endothelial cells inflammatory damage by regulation of NF-κB and JNK signaling pathways. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie 99:451–461. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.060

Zhang X, Azhar G, Williams ED, Rogers SC, Wei JY (2015) MicroRNA Clusters in the Adult Mouse Heart; Age-Associated Changes. BioMed research international 2015:732397. doi:10.1155/2015/732397

Zhang J, Li S-F, Chen H, Song J-X (2016) MiR-106b-5p Inhibits Tumor Necrosis Factor-α-induced Apoptosis by Targeting Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10 in Vascular Endothelial Cells. Chinese medical journal 129:1406–1412. doi:10.4103/0366-6999.183414

Zhang T-N, Li D, Xia J, Wu Q-J, Wen R, Yang N, Liu C-F (2017) Non-coding RNA; A potential biomarker and therapeutic target for sepsis. Oncotarget 8:91765–91778. doi:10.18632/oncotarget.21766

### 8 Thesen

- Eine LPS-Stimulation muriner Monozyten/Makrophagen (Zelllinie RAW264.7) geht mit einer verminderten Expression der miRNAs mmu-miR-9-5p, mmu-miR-15b-5p, mmu-miR-16-5p, mmu-miR-27b-3p, mmu-miR-93-5p, mmu-miR-106b-5p und mmu-miR221-3p einher.
- Zu den Zielgenen der LPS-induziert in Monozyten/Makrophagen vermindert exprimierten miRNAs zählen Mediatoren des TLR-Signalweges, der MAP-Kinase-Signalkaskade und der Apoptose.
- Eine Stimulation humaner Endothelzellen (Zelllinie TIME) mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1β, TNF-α und IFN-γ geht mit einer verminderten Expression der miRNAs hsamiR-23b-3p und hsa-miR-30d-5p sowie einer gesteigerten Expression der miRNAs hsamiR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-155-5p und hsa-miR-221-5p einher.
- Zu den Zielgenen der Zytokin-induziert in Endothelzellen verändert exprimierten miRNAs zählen Mediatoren des JAK-STAT-, IL-1-, TNF- und MAP-Kinase-Signalweges, der Apoptose sowie die vasoaktiven Rezeptoren der Endothelzellen.
- Die verändert exprimierten miRNAs hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-155-5p und hsa-miR-221-5p sind verstärkt mit GO-Begriffen assoziiert, die eine grundlegende Bedeutung dieser miRNAs für die Sepsis-induzierte endothelialen Dysfunktion wahrscheinlich machen.

## 9 Anlagen

|              | NGS-Untersuchung |                            |                | NanoString-Technologie |          |                |
|--------------|------------------|----------------------------|----------------|------------------------|----------|----------------|
|              | gesund           | gesund septisch Verhältnis |                | gesund                 | septisch | Verhältnis     |
| miRNA        | [Reads]          | [Reads]                    | [sept./gesund] | [Reads]                | [Reads]  | [sept./gesund] |
| miR-182      |                  |                            |                | 4                      | 1        | 0,25           |
| ≽ miR-182-5p | 2145             | 1499                       | 0,70           |                        |          |                |
| miR-183      |                  |                            |                | 24                     | 8        | 0,33           |
| ≻ miR-183-5p | 270              | 179                        | 0,66           |                        |          |                |

## Tabelle 6) Aorten: nur bei 1 Verfahren >100 Reads & Sepsis-induziert veränderte Expression.

# Tabelle 7) RAW264.7: nur bei 1 Verfahren >100 Reads & LPS-induziert veränderte Expression.

|                | NGS-Untersuchung |           |                | NanoString-Technologie |           |                |
|----------------|------------------|-----------|----------------|------------------------|-----------|----------------|
|                | unstim.          | LPS-stim. | Verhältnis     | unstim.                | LPS-stim. | Verhältnis     |
| miRNA          | [Reads]          | [Reads]   | [LPS-/unstim.] | [Reads]                | [Reads]   | [LPS-/unstim.] |
| miR-183        |                  |           |                | 1                      | 10        | 10,00          |
| ➢ miR-183-5p   | 163              | 347       | 2,12           |                        |           |                |
| miR-340-3p     | 421              | 273       | 0,65           | 38                     | 26        | 0,68           |
| miR-365        |                  |           |                | 184                    | 288       | 1,57           |
| ≻ miR-365-2-5p | 1                | 5         | 5,00           |                        |           |                |
| miR-709        | 1                | 6         | 6,00           | 74                     | 161       | 2,18           |

## Tabelle 8) RAW264.7: ausschließlich NGS-Analyse & LPS-induziert veränderte Expression.

|             | NGS-Untersuchung |                |                     |  |
|-------------|------------------|----------------|---------------------|--|
|             | unstimuliert     | LPS-stimuliert | Verhältnis          |  |
| miRNA       | [Reads]          | [Reads]        | [LPS-/unstimuliert] |  |
| miR-466n-3p | 109              | 69             | 0,63                |  |

|              | NGS-Untersuchung   |                   |                          | NanoString-Technologie |                   |                          |
|--------------|--------------------|-------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------------|
|              | unstim.<br>[Reads] | Zytokin-<br>stim. | Verhältnis<br>[Zytokin-/ | unstim.<br>[Reads]     | Zytokin-<br>stim. | Verhältnis<br>[Zytokin-/ |
| miRNA        |                    | [Keaus]           | unstinity                |                        | [neaus]           | unstini.j                |
| miR-30c-5p   | 1065               | 640               | 0,60                     | 44                     | 3                 | 0,08                     |
| miR-92a-1-5p | 76                 | 945               | 12,46                    | 3                      | 19                | 7,15                     |
| miR-140-3p   | 291                | 709               | 2,44                     | 5                      | 12                | 2,57                     |
| miR-149-5p   | 118                | 77                | 0,65                     | 62                     | 26                | 0,41                     |
| miR-186-5p   | 1608               | 6186              | 3,85                     | 24                     | 75                | 3,11                     |
| miR-193a-5p  | 98                 | 423               | 4,33                     | 10                     | 14                | 1,40                     |
| miR-195-5p   | 150                | 442               | 2,94                     | 19                     | 50                | 2,65                     |
| miR-217      | 105                | 73                | 0,70                     | 19                     | 10                | 0,50                     |
| miR-224-5p   | 990                | 2106              | 2,13                     | 2                      | 9                 | 4,50                     |
| miR-369-3p   | 753                | 1379              | 1,83                     | 7                      | 12                | 1,68                     |
| miR-425-5p   | 305                | 531               | 1,74                     | 16                     | 26                | 1,58                     |
| miR-454-3p   | 184                | 352               | 1,91                     | 24                     | 91                | 3,87                     |
| miR-502-3p   | 90                 | 168               | 1,88                     | 2                      | 4                 | 2,00                     |
| miR-584-5p   | 96                 | 188               | 1,96                     | 3                      | 5                 | 1,67                     |
| miR-629-5p   | 65                 | 284               | 4,40                     | 4                      | 10                | 2,20                     |
| miR-652-3p   | 115                | 298               | 2,60                     | 9                      | 18                | 2,00                     |
| miR-889-3p   | 94                 | 144               | 1,53                     | 5                      | 16                | 3,46                     |
| miR-1307-3p  | 51                 | 153               | 3,02                     | 14                     | 52                | 3,77                     |
| miR-4443     | 5                  | 30                | 6,00                     | 235                    | 554               | 2,35                     |

# Tabelle 9) TIME: nur bei 1 Verfahren >100 Reads & Zytokin-induziert veränderte Expression.

|               | NGS-Analyse  |                    |                         |  |  |
|---------------|--------------|--------------------|-------------------------|--|--|
|               | Unstimuliert | Zytokin-stimuliert | Verhältnis              |  |  |
| miRNA         | [Reads]      | [Reads]            | [Zytokin-/unstimuliert] |  |  |
| let-7d-3p     | 613          | 1120               | 1,83                    |  |  |
| let-7i-3p     | 97           | 143                | 1,47                    |  |  |
| miR-10a-3p    | 94           | 154                | 1,64                    |  |  |
| miR-10b-3p    | 42           | 136                | 3,25                    |  |  |
| miR-16-2-3p   | 246          | 607                | 2,47                    |  |  |
| miR-21-3p     | 414          | 1792               | 4,33                    |  |  |
| miR-22-5p     | 97           | 327                | 3,37                    |  |  |
| miR-23a-5p    | 42           | 454                | 10,92                   |  |  |
| miR-24-2-5p   | 51           | 155                | 3,03                    |  |  |
| miR-27a-5p    | 198          | 1780               | 9,01                    |  |  |
| miR-29b-1-5p  | 76           | 1145               | 15,16                   |  |  |
| miR-30c-2-3p  | 113          | 68                 | 0,60                    |  |  |
| miR-99b-3p    | 133          | 210                | 1,58                    |  |  |
| miR-106b-3p   | 214          | 489                | 2,28                    |  |  |
| miR-125b-1-3p | 100          | 380                | 3,80                    |  |  |
| miR-126-5p    | 3673         | 7797               | 2,12                    |  |  |
| miR-130b-5p   | 441          | 637                | 1,44                    |  |  |
| miR-136-3p    | 166          | 240                | 1,44                    |  |  |
| miR-195-3p    | 15           | 250                | 16,11                   |  |  |
| miR-222-5p    | 192          | 283                | 1,48                    |  |  |
| miR-374c-3p   | 280          | 529                | 1,89                    |  |  |
| miR-424-3p    | 272          | 440                | 1,62                    |  |  |
| miR-493-5p    | 194          | 407                | 2,09                    |  |  |
| miR-500a-3p   | 73           | 108                | 1,47                    |  |  |
| miR-3074-5p   | 3030         | 6925               | 2,29                    |  |  |
| miR-3120-5p   | 430          | 847                | 1,97                    |  |  |
| miR-3184-3p   | 1528         | 4388               | 2,87                    |  |  |

# Tabelle 10) TIME: ausschließlich NGS-Analyse & Zytokin-induziert veränderte Expression.

### Selbstständigkeitserklärung

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere bei der inhaltlichen Erstellung von niemandem eine entgeltliche oder geldwertige Leistung in Anspruch genommen zu habe.

Bite Schnictt

Birte Schmidt, Halle (Saale), 18.08.2019

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Sehr geehrte Damen und Herren,

Ich versichere, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Bite Schnictt

Birte Schmidt, Halle (Saale), 18.08.2019

### Lebenslauf

Persönliche Daten

| Anschrift:     | Oleariusstraße 8, 06108 Halle (Saale), Deutschland |
|----------------|--|
| Geburtstag:    | 13.09.1990   |
| Geburtsort:    | Frankfurt am Main                                  |
| Telefonnummer: | +4915161484744                                     |
| E-Mail:        | birteschmidt09@gmail.com                           |

### Klinische & akademische Erfahrungen

- August 2018 Veröffentlichung: "Septic-Induced microRNA Expression Modulations Are Linked to Angiogenesis, Vasomotion, and Hypoxia-Induced Processes" in Advances in Experimental Medicine and Biology – Springer, 2018; 1072:227-231; doi: 10.1007/978-3-319-91287-5\_36
- April 2018 bis jetztAssistenzärztinfürOrthopädieundUnfallchirurgie,Carl-Basedow-Klinikum Merseburg, Chefarzt Dr. Göbel
- November 2017 Teilnahme am 4. Kongress für Doktorandinnen und Doktoranden der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle (Saale)
- August 2017Teilnahme am 45. Kongress der Internationalen Gesellschaft für<br/>Sauerstofftransport in Gewebe (ISOTT) in Halle (Saale)
- Juli Dezember 2017Assistenzärztin für Orthopädie und Unfallchirurgie, Carl-<br/>Basedow-Klinikum Merseburg, Chefarzt Dr. Göbel

#### Ausbildung

November 2016 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (M3), Note: sehr gut

Nov. '15 – Oktober '16 Praktisches Jahr

XIII

| August/ September 2012Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1), Note: gutOktober '10 – März '17Medizinstudium, MLU Halle-WittenbergAugust '07 – Januar '08Kamo-High-School, Whangarei, Neuseeland2001 – 2010Gymnasium, Albertus-Magnus-Schule, Viernheim, Note: gut | Oktober 2015            | Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (M2), Note: gut |
|---|-------------------------|--|
| Oktober '10 – März '17Medizinstudium, MLU Halle-WittenbergAugust '07 – Januar '08Kamo-High-School, Whangarei, Neuseeland2001 – 2010Gymnasium, Albertus-Magnus-Schule, Viernheim, Note: gut  | August/ September 2012  | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1), Note: gut  |
| August '07 – Januar '08Kamo-High-School, Whangarei, Neuseeland2001 – 2010Gymnasium, Albertus-Magnus-Schule, Viernheim, Note: gut  | Oktober '10 – März '17  | Medizinstudium, MLU Halle-Wittenberg                     |
| 2001 – 2010 Gymnasium, Albertus-Magnus-Schule, Viernheim, Note: gut   | August '07 – Januar '08 | Kamo-High-School, Whangarei, Neuseeland                  |
|   | 2001 – 2010             | Gymnasium, Albertus-Magnus-Schule, Viernheim, Note: gut  |

1997 – 2001 Grundschule, Nibelungenschule, Viernheim

#### Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau PD Dr. Julia Schumann für ihre tatkräftige wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation.

Auch Herrn Prof. Dr. Michael Gekle und den anderen Mitarbeitern des Julius-Bernstein-Institutes für Physiologie möchte ich für ihre Unterstützung während meiner Tätigkeit in ihrem Forschungslabor danken. Besonders Herrn PD Dr. Gerald Schwerdt gilt mein Dank für die Einarbeitung in die ddPCR.

Außerdem danke ich Herrn PD Dr. Knut Krohn als Leiter der Core Unit-Technologie der Universität Leipzig Dank für die NGS-Untersuchung und Frau Kerstin Körber-Ferl, MTA des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Halle (Saale), für ihre Hilfestellung bei der NanoString-Untersuchung

Ebenfalls möchte ich meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe der Anästhesie, besonders Frau Anja Leimert, Frau Claudia Rösler und Frau Christine Hellwing, für ihre methodische und emotionale Unterstützung während meiner Zeit im Institut danken.

Besonderen Dank schulde ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern Elke und Reiner Schmidt, für ihre umfassende Unterstützung. Mit ihrer Hilfe konnte ich mir nach Abschluss des Medizinstudiums den zeitlichen Rahmen nehmen, um einen Einblick in die Welt der Wissenschaft zu bekommen. Und natürlich danke ich auch meinem Freund Dr. Maximilian Scheer, für das selbstverständliche Zurverfügungstellen seines Computers, nachdem mein eigener die Funktion verweigerte, und die Motivation im Alltag die Doktorarbeit nicht aus den Augen zu verlieren.