

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Analyse von Änderungen der Genexpression mikrovaskulärer Endothelzellen im
pro-inflammatorischen Milieu: Gegenüberstellung von relativer und absoluter
Quantifizierung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Kevin Kuhlmann

geboren am 14.06.1991 in Sulingen

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

Gutachterin: Frau Prof. Dr. med. Heike Kielstein

Gutachter: Herr PD Dr. Uwe Rückschloß, Würzburg

02.03.2021

04.11.2021

Referat

Inhalt der Dissertation ist ein Vergleich der Amplifikationsmethoden qRT-PCR und ddPCR. Es wurde untersucht, ob die Ergebnisse der beiden Verfahren kongruent sind und in welcher Weise sie miteinander korrelieren. Hierfür wurde geprüft, ob Effekte eines inflammatorischen Milieus auf die Genexpression mikrovaskulärer Endothelzellen durch beide Methoden gleichermaßen abbildbar sind. Zur Bearbeitung der Fragestellung dienten humane mikrovaskuläre Endothelzellen (Zelllinie TIME, ATCC® CRL-4025), welche durch die Zytokine TNF- α , IL-1 β und INF- γ stimuliert wurden, um eine Entzündungsreaktion zu simulieren. Zusätzlich wurden die Endothelzellen in einem weiteren Versuchsansatz mit unterschiedlichen mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (PUFA) versetzt, um den Effekt dieser nutritiven Komponente auf eine Inflammation darzustellen. Die anschließend durch beide Methoden gemessenen Veränderungen der Genexpression wurden einander gegenübergestellt. In Bezug auf den Nachweis eines Stimulationseffektes einschließlich seiner Richtung ergab sich für die beiden Methoden eine Übereinstimmung bei 94,7% der durchgeführten Analysen. Die Gegenüberstellung der mittels qRT-PCR und ddPCR indizierten Ratios zwischen stimulierten und unstimulierten Proben (= Effektausmaß der Stimulation) zeigte, dass bei keiner der beiden Methoden eine Tendenz zur generellen Über- bzw. Unterschätzung des Stimulationseffektes vorlag. Diskrepanzen bei den durch qRT-PCR bzw. ddPCR ermittelten Effektausmaßen waren vordergründig durch Messdaten bedingt, welche an den Grenzbereichen der jeweiligen linearen dynamischen Reichweite der getesteten Verfahren lagen. Dies unterstreicht die Bedeutung der linearen dynamischen Reichweite für die Validität der erzielten Daten bei beiden Analysemethoden. Darüber hinaus wurde ein negativ-exponentieller Zusammenhang zwischen den per qRT-PCR ermittelten CT-Werten und den für identische Proben per ddPCR ermittelten Kopienzahlen/ μ l festgestellt, welcher aber nicht geeignet ist, um aus semi-quantitativen Daten der qRT-PCR auf die Konzentration des analysierten Zielgens zu schließen. Für die absolute Quantifizierung einer Probe bleibt die ddPCR daher das Verfahren der Wahl. Vor dem Hintergrund der Entbehrlichkeit einer externen Kalibrierung mittels Referenzgen empfiehlt sich die ddPCR zudem immer dann, wenn die Expression klassischer Referenzgene durch die Versuchsbedingungen beeinflusst wird. Die Stärken der qRT-PCR liegen in einer höheren dynamischen Reichweite und einem geringeren Ressourcenbedarf. Zudem ermöglicht die seit Jahrzehnten etablierte Methode einen hohen Durchsatz und eine Automatisierung.

Kuhlmann, Kevin: Analyse von Änderungen der Genexpression mikrovaskulärer Endothelzellen im pro-inflammatorischen Milieu: Gegenüberstellung von relativer und absoluter Quantifizierung, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2020

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Quantifizierungsmethoden und ihre Anwendungsgebiete	1
1.1.1 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	2
1.1.2 Digitale Droplet PCR (ddPCR)	2
1.2 Mikrovaskuläre Endothelzellen.....	3
1.3 Einfluss von Inflammation auf die Funktion endothelialer Zellen	4
1.3.1 Perfusion von Gewebe und Gefäßpermeabilität	4
1.3.2 Diapedese.....	5
1.3.3 Gerinnungsfunktion	6
1.3.4 Entstehung eines pro-inflammatorischen Phänotyps.....	7
1.3.5 Zellproliferation und -differenzierung	8
1.3.6 Chemokine	8
1.4 Einfluss von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (PUFA) auf die Inflammation	9
1.4.1 Omega-3-Fettsäuren	9
1.4.2 Omega-6-Fettsäuren	10
2 Zielstellung	12
3 Material und Methodik	13
3.1 Material.....	13
3.1.1 Geräte.....	13
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	14
3.1.3 Chemikalien und Lösungen	15
3.1.4 Zelllinie	16
3.1.5 Kits.....	16
3.1.6 Synthetische Oligonukleotide	16
3.1.7 Software und Datenbanken	17
3.2 Methodik.....	18
3.2.1 Zellkultur	18
3.2.2 Zell-Stimulation und -Supplementierung.....	19
3.2.3 Bestimmung der Zellviabilität	19
3.2.4 RNA-Isolation	20
3.2.5 Bestimmung der RNA-Konzentration- und Reinheit.....	21
3.2.6 cDNA-Synthese.....	21
3.2.7 Primerkonstruktion und -Etablierung	22
3.2.8 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	25
3.2.9 Digitale Droplet PCR (ddPCR)	26
3.2.10 Statistische Auswertung.....	27

4 Ergebnisse	29
4.1 Zellviabilität	29
4.2 Primeretablierung	30
4.3 Gegenüberstellung von qRT-PCR und ddPCR.....	31
4.3.1 Ansatz 1	32
4.3.1.1 Adrenorezeptoren.....	32
4.3.1.2 Angiotensin-assoziierte Proteine	34
4.3.1.3 Endothelin-Rezeptoren	36
4.3.2 Ansatz 2	37
4.3.2.1 Adhäsionsproteine	37
4.3.2.2 Koagulationsfaktoren	40
4.3.2.3 Pro-inflammatorische Botenstoffe	43
4.3.2.4 Proliferations- und Differenzierungsfaktoren	46
4.3.2.5 Chemokine	47
4.3.3 Vergleich der Daten von qRT-PCR und ddPCR bei Ansatz 1.....	49
4.3.4 Vergleich der Daten von qRT-PCR und ddPCR bei Ansatz 2.....	51
5 Diskussion.....	54
5.1 Versuchsdesign	54
5.2 Folgen eines pro-inflammatorischen Milieus	56
5.2.1 Ansatz 1	56
5.2.2 Ansatz 2	57
5.3 Gegenüberstellung von qRT-PCR und ddPCR.....	60
6 Zusammenfassung	63
7 Literaturverzeichnis.....	64
8 Thesen	78
9 Selbstständigkeitserklärung	VII
10 Erklärung über frühere Promotionsversuche	VIII
11 Danksagung.....	IX

Abkürzungsverzeichnis

A

AA	arachidonic acid (engl.), Arachidonsäure (dt.)
ACE1	angiotensin converting enzyme 1 (engl.), Angiotensin-konvertierendes Enzym 1 (dt.)
ACTB	β -actin (engl.), β -Aktin (dt.)
Adra1b	α -adrenergic receptor type 1b (engl.), α_{1b} -Adrenorezeptor (dt.)
Adra1d	α -adrenergic receptor type 1d (engl.), α_{1d} -Adrenorezeptor (dt.)
Adrb2	β -adrenergic receptor type 2 (engl.), β_2 -Adrenorezeptor (dt.)
Aqua a.i.	aqua ad iniectabilia (It.), RNase-freies Wasser (dt.)
Aqua dest.	aqua destillata (It.), destilliertes Wasser (dt.)
ARDS	acute respiratory distress syndrome (engl.) Akutes Lungenversagen (dt.)
ATCC	American Type Culture Collection
ATIP1	angiotensin II receptor interacting protein 1 (engl.), Angiotensin II-Rezeptor interagierendes Protein 1 (dt.)
ATRAP	angiotensin II type 1 receptor associated protein (engl.), Angiotensin II-Rezeptor 1 assoziiertes Protein

B

bp base pair (engl.), Basenpaar (dt.)

C

CD31	cluster of differentiation 31 (engl.), Unterscheidungsgruppe 31 (dt.)
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (engl.), komplementäre Desoxyribonukleinsäure (dt.)
CNV	copy number variation (engl.), Kopienzahlvarianten (dt.)
CO ₂	carbon dioxide (engl.), Kohlenstoffdioxid (dt.)
CT	reshold cycle (engl.), Schwellenwert-Zyklus (dt.)

D

ddPCR	digital droplet polymerase chain reaction (engl.), Digitale Droplet Polymerase-Ketten-Reaktion (dt.)
DHA	docosahexaenoic acid (engl.), Dokosahexaensäure (dt.)
DIC	disseminated intravascular coagulopathy (engl.) Disseminierte intravasale Gerinnung (dt.)
DNA	desoxyribonucleic acid (engl.), Desoxyribonukleinsäure (dt.)
dNTP	desoxy-nucleoside triphosphate (engl.) Desoxynukleosidtriphosphat (dt.)

E

EdnrA	endothelin receptor type A (engl.), Endothelin-Rezeptor Typ A (dt.)
EdnrB	endothelin receptor type B (engl.), Endothelin-Rezeptor Typ B (dt.)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (engl.), Ethylendiamintetraessigsäure (dt.)
EPA	eicosapentaenoic acid (engl.), Eikosapentaensäure (dt.)
EtOH	ethanol (engl.), Ethanol (dt.)

F

FKS	fetal calf serum (engl.), Fetales Kälberserum (dt.)
-----	---

G

GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (engl.), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (dt.)
GOI	gene of interest (engl.), Zielgen (dt.)
GM-CSF	granulocyte monocyte colony stimulating factor (engl.), Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (dt.)

H

hTERT	human telomerase reverse transcriptase (engl.), humane Telomerase Reverse Transkriptase (dt.)
-------	---

I

ICAM-1	intercellular adhesion molecule type 1 (engl.), interzelluläres Adhäsionsmolekül Typ 1 (dt.)
IL-1 β	interleukin 1 β (engl.), Interleukin 1 β (dt.)
IL-6	interleukin 6 (engl.), Interleukin 6 (dt.)
IL-8	interleukin 8 (engl.), Interleukin 8 (dt.)
IL-10	interleukin 10 (engl.), Interleukin 10 (dt.)
INF- γ	interferon γ (engl.), Interferon γ (dt.)

J

K

kb	kilobase (engl.), Kilobase (dt.)
----	----------------------------------

L

l	litre (engl.), Liter (dt.)
LA	linoleic acid (engl.), Linolsäure (dt.)
LNA	α -linolenic acid (engl.), α -Linolensäure (dt.)

M

MBI	methylene bridge index (engl.), Methylen-Brücken-Index (dt.)
MCP-1	monocyte chemoattractant protein type 1 (engl.), Monozytenattraktions-Protein 1 (dt.)
μ	micro- (engl., prefix), Mikro- (dt., Präfix)
min	minute (engl.), Minute (dt.)
mRNA	messenger ribonucleic acid (engl.), Boten-Ribonukleinsäure (dt.)

N

N	number of biological replicates (engl.), Anzahl der biologischen Replikate (dt.)
n	number of technical replicates (engl.), Anzahl der technischen Replikate (dt.)
NCBI	National Center for Biotechnology
NF- κ B	nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells (engl.), Nukleärer Faktor „Kappa-Leichtketten-Verstärker“ aus aktivierten B-Zellen (dt.)
NRT	no reverse transcriptase sample (engl.), Nicht-Reverse-Transkriptase-Probe (dt.)

O

P

PAI-1	plasminogen activator inhibitor type 1 (engl.), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (dt.)
PBS	phosphate buffered saline (engl.), Phosphat-gepufferte Salzlösung (dt.)
PCR	polymerase chain reaction (engl.), Polymerase-Kettenreaktion (dt.)
PGE ₂	prostaglandin E ₂ (engl.), Prostaglandin E ₂ (dt.)
PGE ₃	prostaglandin E ₃ (engl.), Prostaglandin E ₃ (dt.)
PGI ₂	prostaglandin I ₂ (engl.), Prostaglandin I ₂ (dt.)
PUFA	polyunsaturated fatty acid (engl.), mehrfach-ungesättigte Fettsäure (dt.)

Q

qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction (engl.), Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (dt.)
---------	---

R

RAAS	renin-angiotensin-aldosterone system (engl.), Renin-Angiotensin-Aldosteron System (dt.)
rhEGF	recombinant human epidermal growth factor (engl.), rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor (dt.)

rhFGF	recombinant human fibroblast growth factor (engl.), rekombinanter humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor (dt.)
rhIGF1	recombinant human insulin-like growth factor 1 (engl.), rekombinanter humaner insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (dt.)
rhVEGF	recombinant human vascular endothelial growth factor (engl.), rekombinanter humaner vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (dt.)
RQ	relative quantification (engl.), Relative Quantifizierung (dt.)
S	
S	svedberg (engl.), Svedberg (dt.)
sec	second (engl.), Sekunde (dt.)
T	
T _m	melting temperature (engl.), Schmelztemperatur (dt.)
TAE	tris-acetate-EDTA buffer (engl.), Tris-Acetat-EDTA Puffer (dt.)
TF	tissue factor (engl.), Gewebefaktor (dt.)
TGF-β	tumor growth factor β (engl.), Tumor-Wachstumsfaktor β (dt.)
TIME	telomerase immortalized microvascular endothelial cell (engl.), Telomerase-immortalisierte mikrovaskuläre Endothelzelle (dt.)
TLR	toll-like receptor (engl.), Toll-Like-Rezeptor (dt.)
TNF-α	tumor necrosis factor α (engl.), Tumor-Nekrose-Faktor α
tPA	tissue plasminogen activator (engl.), gewebespezifischer Plasminogenaktivator (dt.)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane (engl.), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (dt.)
U	
U	unit (engl.), Enzymeinheit (dt.)
V	
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule type 1 (engl.), vaskuläres Zelladhäsionsmolekül Typ 1 (dt.)
VEGF	vascular endothelial growth factor (engl.), Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (dt.)
vWF	von Willebrand factor (engl.), von Willebrand-Faktor (dt.)
W	
XYZ	

1 Einleitung

1.1 Quantifizierungsmethoden und ihre Anwendungsgebiete

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) ist ein laborchemischer Prozess, der den physiologischen Vorgang der Replikation in Körperzellen nachahmt. Im Bereich der Forschung wird die PCR *in vitro* zur Genamplifikation genutzt. Sie ermöglicht es kleinste Mengen von Desoxyribonukleinsäure-Sequenzen (DNS, engl. desoxyribonucleic acid, DNA) in hoher Zahl zu vervielfältigen. Angewandt wird die PCR dabei in vielen unterschiedlichen medizinischen Bereichen: in der forensischen Medizin zur Identifizierung von Personen und zur Abklärung von Verwandtschaftsverhältnissen [1], zur Detektion von Erkrankungen z.B. Virusinfektionen anhand von viraler RNA oder DNA [2,3], zur pränatalen Diagnostik [4] sowie im Rahmen der Herstellung von Medikamenten mittels gentechnisch veränderter Mikroorganismen [5]. In der medizinischen Grundlagenforschung wird die PCR häufig auch zur Klärung der Frage angewandt, inwiefern sich die Genexpression von Zielgenen (engl. gene of interest, GOI) in humanen Körperzellen unter bestimmten Voraussetzungen (z.B. Änderungen des äußeren Milieus) ändert. Voraussetzungen einer PCR sind: (1) eine zumindest teilweise bekannte Nukleinsäure-Sequenz, also die genaue Abfolge der Nukleotide, (2) zu dieser bekannten Sequenz passende Oligonukleotid-Primer, (3) Desoxy-Nukleosidtriphosphat-Moleküle (engl. desoxy-nucleoside triphosphate, dNTPs) als Bausteine für die zu synthetisierende DNA und (4) eine hitzestabile Polymerase. Die PCR läuft in drei sich vielfach wiederholenden Phasen ab. Die erste Phase ist die Denaturierung, bei der sich unter hoher Temperatur (ca. 96°C) die Wasserstoffbrückenbindungen des Nukleinsäure-Doppelstranges aufspalten und zwei separate Einzelstränge freigeben. Während der Primerhybridisierungs- oder Annealing-Phase lagern sich die Oligonukleotid-Primer am 3'-Ende der Nukleinsäure-Einzelstränge an. Die hierfür nötige Reaktionstemperatur ist abhängig vom eingesetzten Primerpaar (ca. 55-65°C). Bei der darauf folgenden Elongationsphase synthetisiert die Polymerase bei ca. 72°C, ausgehend von den an die Nukleinsäure-Einzelstränge angelagerten Primern unter Verbrauch der dNTPs, komplementäre Einzelstränge. Über mehrere Durchläufe dieser Phasen wird hierdurch die betrachtete Nukleinsäure-Sequenz vervielfältigt. Für die erforderlichen wechselnden Temperaturstufen kommt in der Regel ein PCR-Thermozykler zum Einsatz.

1.1.1 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Eine Variante der PCR ist die sogenannte quantitative Echtzeit-PCR (engl. quantitative real-time PCR, qRT-PCR), bei der durch ein Fluoreszenzsignal eine Quantifizierung des Amplifikats simultan zur Synthese möglich ist. Die Signalstärke nimmt dabei proportional zur DNA-Menge zu. In der vorliegenden Dissertation wurde die SYBR-Green qRT-PCR genutzt [6]. Bei dieser Methode wird ein Cyanin-Farbstoff verwendet, welcher sich sequenzunabhängig zwischen die Einzelstränge von doppelsträngiger DNA anlagert und im gebundenen Zustand ein Fluoreszenzsignal aussendet. Mit zunehmender Menge an doppelsträngiger DNA im Rahmen der Amplifikation nimmt die Stärke des Fluoreszenzsignals proportional zu [7].

Bei der relativen qRT-PCR wird das gemessene Fluoreszenzsignal des betrachteten Zielgens auf dasjenige eines Referenzgens bezogen. Grundlage ist die Annahme, dass sich die Expression dieser im englischen auch als housekeeping gene (dt. Haushaltsgen) bezeichneten Kontrolle auch unter Änderungen der äußeren Rahmenbedingungen (z.B. Änderungen des pH-Wertes oder in der Anwesenheit von Botenstoffen) im Idealfall nicht verändert. Dadurch können mittels einer Berechnungsmethode, der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, Aussagen darüber getroffen werden, wie sich die Expression des Zielgens relativ verändert, z.B. eine Erhöhung auf das Doppelte oder eine Reduktion auf ein Drittel [8,9]. In dieser Arbeit wurden 2 etablierte Referenzgene verwendet: in Ansatz 1 die 18S rRNA [10] und in Ansatz 2 humanes β -Aktin (engl. β -actin, ACTB) [11]. Ribosomale Ribonukleinsäuren (engl. ribosomal ribonucleic acid, rRNA) sind funktionaler Bestandteil der Ribosomen, welche für die Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen verantwortlich sind. Die Abkürzung „S“ ist hierbei ein Maß für die Größe der jeweiligen rRNA, bemessen an ihrem Sedimentationsverhalten in Svedberg. Die 18S rRNA ist Teil der kleinen Untereinheit 40S und eine wichtige Komponente aller eukaryotischen Ribosomen. ACTB ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, welches unabdingbar ist für Aufbau, Struktur und Integrität von Zellen durch Ausbildung von Zytoskelettfilamenten. Darüber hinaus ist ACTB beteiligt an Prozessen der Zellmotilität und dem Kontraktionsvorgang von Muskelzellen [12].

1.1.2 Digitale Droplet PCR (ddPCR)

Die digitale Droplet PCR (engl. digital droplet polymerase chain reaction, ddPCR) ist eine seit 2011 verfügbare Methode, mit der eine absolute Quantifizierung von Genmaterial möglich ist [13,14]. Bei der Analyse werden grundsätzlich die gleichen Reagenzien und Prozessschritte verwendet wie bei der qRT-PCR. Die Besonderheit der Methode liegt in der Aufteilung des Reaktionsansatzes vor der Amplifizierung im PCR-Thermozykler in ca. 20-25.000 Kompartimente bzw. Reaktionsräume in Form von Nano-Tröpfchen (engl. droplet). Diese Tröpfchen werden durch eine Wasser-Öl-Emulsion erzeugt und schließen die PCR-Reagenzien

ein. Nach der Amplifizierung der untersuchten Gene innerhalb der Nano-Tröpfchen werden die Fluoreszenzsignale jedes einzelnen Kompartiments registriert und ausgelesen. Hierbei wird erfasst, in wie vielen Kompartimenten die Zielsequenz amplifiziert wurde. Die Auslesung unterscheidet hierbei jedoch nur zwischen positiven und negativen Reaktionen. Die jeweilige Menge an Amplifikat pro Kompartiment wird nicht berücksichtigt. Um diese in die Analyse mit einzubeziehen, wird unter Anwendung der Poisson-Verteilung die Konzentration des Zielgens in der untersuchten Probe ermittelt. Bei der ddPCR sind im Vergleich zur qRT-PCR keine Standardkurven anhand von Referenzgenen notwendig. Zusätzlich kann der Einfluss von PCR-Inhibitoren und Probenkontaminationen durch Endpunkt-Messungen reduziert werden [15,16]. Die Detektion von sehr seltenen Zielsequenzen soll durch die Kompartimentierung der PCR-Gesamtreaktion erleichtert werden, da hier auch einzelne vorhandene Kopien pro Nano-Tröpfchen über die absolute Quantifizierung erfasst werden könnten [17]. Der dynamische Messbereich der ddPCR liegt laut Herstellerangaben zwischen 0,05 und 6000 Kopien/ μ l [18].

1.2 Mikrovaskuläre Endothelzellen

Das Endothel bildet die innerste auskleidende Schicht des menschlichen Blut- und Lymphgefäßsystems. Es besitzt eine Oberfläche von ca. 5000 m² [19] und besteht aus einem einschichtigen Plattenepithelverband, welcher einer Basallamina aufliegt. Die luminal an den Endothelzellen aufsitzende Glykokalyx besitzt wichtige Barrierefunktionen im Rahmen des transzellulären Stofftransportes und reguliert somit den Stoffaustausch zwischen Plasma und Gewebe [20]. Weitere Funktionen sind die Regulation der Perfusion [21] und des Blutdrucks [22–24] sowie die Initiierung bzw. Unterdrückung von Gerinnungsprozessen [25]. Bei pro-inflammatorischen Prozessen spielt das Endothel sowohl als Zielstruktur als auch im Rahmen der Aufrechterhaltung von Entzündungen eine wichtige Rolle.

Mikrovaskuläre Endothelzellen bezeichnen diejenigen gefäßauskleidenden Zellen, die sich in Arteriolen, präkapillären Sphinktern, Kapillaren, postkapillären Venolen und muskulären Venolen befinden. Für die durchgeführten Versuche wurde die humane Telomerase-immortalisierte mikrovaskuläre endotheliale Zelllinie TIME (ATCC® CRL-4025™, American Type Culture Collection) verwendet [26]. Ursprünglich wurden diese Zellen aus gesundem dermaletem Gewebe neonataler Vorhaut gewonnen und anschließend durch eine gezielte Infektion mittels dem Retrovirus WZLblast3:hTERT mit humaner Telomerase Reverse Transkriptase (engl. human telomerase reverse transcriptase, hTERT) immortalisiert. Bei Ansicht unter dem Lichtmikroskop zeigt diese Zelllinie eine endotheliale Morphologie. Die TIME-Zelllinie ist diploid mit normalem männlichen Karyotyp (46, XY) und geringer Rate von Polyploidie.

1.3 Einfluss von Inflammation auf die Funktion endothelialer Zellen

1.3.1 Perfusion von Gewebe und Gefäßpermeabilität

Eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit einer pro-inflammatorischen systemischen Reaktion spielt die Regulation der Gewebepfusion und die Veränderung der Permeabilität von Gefäßen für lösliche Stoffe sowie für Zellen des Immunsystems. Im Zentrum dieser Reaktionen stehen drei zentrale Regulationsysteme: (1) das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (engl. renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS), (2) das sympathische Nervensystem mit seinen Botenstoffen Adrenalin und Noradrenalin sowie (3) das Endothelin-System.

Das RAAS steuert über verschiedene Botenstoffe die Durchblutung von Gewebe, die Permeabilität des Endothels und die Aufrechterhaltung bzw. die Initiierung von Entzündungsreaktionen [27–30]. Eine wichtige Komponente bildet hierbei das Angiotensin II. Angiotensin II wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym 1 (engl. angiotensin-converting enzyme 1, ACE1) aus Angiotensin I gebildet, welches durch die Spaltung von Angiotensinogen in den Hepatozyten synthetisiert wird. Angiotensin II erhöht die Gefäßpermeabilität über eine Stimulation der Prostaglandin-Synthese [31] sowie des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (engl. vascular endothelial cell growth factor, VEGF) [32]. Zusätzlich stimuliert Angiotensin II die Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen wie dem interzellulären Adhäsionsmolekül Typ 1 (engl. intercellular adhesion molecule type 1, ICAM-1) und dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül Typ 1 (engl. vascular cell adhesion molecule type 1, VCAM-1) an der Zelloberfläche sowie zur Produktion von Chemokinen wie dem Monozytenattraktions-Protein 1 (engl. monocyte chemoattractant protein type 1, MCP-1), Interleukin 6 (engl. interleukin 6, IL-6) und Interleukin 8 (engl. interleukin 8, IL-8) [33–35]. Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei Gene untersucht, welche die Funktion von Angiotensin II beeinflussen: ACE1, das Angiotensin II-Rezeptor-interagierende Protein 1 (engl. angiotensin II receptor interacting protein type 1, ATIP1) und das Angiotensin II-Rezeptor 1 assoziierte Protein (engl. angiotensin II type 1 receptor-associated protein, ATRAP). ACE1 steuert die Menge an verfügbarem Angiotensin II über die Spaltung seines Pro-Peptids Angiotensin I [36]. Zudem vermindert ACE1 über die Spaltung von Bradykinin die Stickstoffmonoxid-abhängige Vasodilatation [37]. ATIP1 beeinflusst die intrazellulären Signalkaskaden des Angiotensin II-Rezeptors Subtyp 2 und vermittelt einen hemmenden Effekt auf die zelluläre Proliferation unabhängig von der Anwesenheit von Angiotensin II [38,39]. ATRAP bindet an den C-terminalen Anteil des Angiotensin II-Rezeptor 1

und vermindert somit Angiotensin II-induzierte Funktionen, wie Hypertension und Gefäßpermeabilitätssteigerung [40–42].

Neben dem RAAS besitzt auch das sympathische Nervensystem einen großen Einfluss auf die Aufrechterhaltung und Fortführung einer bestehenden Inflammationsreaktion. α -Adrenorezeptoren wie der α_{1b} -Adrenorezeptor (engl. α -adrenergic receptor type 1b, Adra1b) oder der α_{1d} -Adrenorezeptor (engl. α -adrenergic receptor type 1d, Adra1d) nehmen über die Aktivierung von Immunzellen direkten Einfluss auf die Entzündungsreaktion [43]. Zudem vermitteln α -Adrenorezeptoren die Steigerung des Blut- und Lymphflusses in entzündeten Körperregionen, die Umverteilung von verschiedenen Immunzellen in Erreger-besiedelte Areale sowie die vermehrte Proliferation von Immunzellen im Knochenmark [44–47]. β -Adrenorezeptoren wie der β_2 -Adrenorezeptor (engl. β -adrenergic receptor type 2, Adrb2) sind ebenfalls an der Aktivierung der Immunzell-Proliferation beteiligt [48]. Weiterhin wirken β -Adrenorezeptoren förderlich auf die Produktion und Ausschüttung des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin 10 (engl. interleukin 10, IL-10) durch regulatorische T-Helferzellen [49,50]. Das Endothelin-System besteht aus verschiedenen Rezeptoren, die auf den Botenstoff Endothelin reagieren und nach Aktivierung eine Regulation des Blutflusses über Vasokonstriktion bzw. -dilatation bewirken. Der Endothelin-A-Rezeptor (engl. endothelin receptor type A, EdnrA) hat bei Stimulation eine starke Vasokonstriktion zur Folge, besonders an hirnersorgenden Arteriolen und entlang peripherer Nerven [51–53]. Endothelin-B-Rezeptoren (engl. endothelin receptor type B, EdnrB) werden in die Subtypen 1 und 2 unterteilt. Subtyp 2 bewirkt wie EdnrA eine Vasokonstriktion, während Subtyp 1 eine Vasodilatation der betroffenen Gefäße zur Folge hat [54].

1.3.2 Diapedese

Die Diapedese beschreibt den Vorgang des Hindurchtretens von löslichen Stoffen oder Zellen durch das Endothel. Sie ist ein wichtiger Faktor zur immunologischen Bekämpfung von Pathogenen, wie Bakterien oder Pilzen, in Geweben außerhalb des Blutgefäßsystems. Initial werden Teile dieser Pathogene von körpereigenen „Fresszellen“, z.B. Makrophagen, dendritischen Zellen oder neutrophilen Granulozyten, phagozytiert. Diese schütten Mediatorbotenstoffe, sogenannte Zyto- und Chemokine aus und aktivieren damit umliegende Endothelzellen. Es kommt zur Expression verschiedener Oberflächenproteine, welche das Anheften von Leukozyten an die Zellmembran der Endothelzellen ermöglichen. Diese Oberflächenproteine werden Adhäsionsmoleküle genannt. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Adhäsionsmoleküle sind ICAM-1 und VCAM-1. ICAM-1 und VCAM-1 binden den leukozytären Oberflächenrezeptor Integrin und fördern damit die Transmigration der weißen

Blutkörperchen durch das Endothel [55–57]. Daneben spielen beide Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle in der Auflösung der dichten Zell-Zell-Verbindungen von Endothelzellen, den *Zonae occludentes* oder „tight junctions“. Diese verhindern im aktiven Zustand den Durchtritt von gelösten Stoffen durch die Endothelzellschicht. Bei Auflösung dieser Zell-Zell-Verbindungen tritt vermehrt Plasma mit gelösten immunologischen Botenstoffen in das subendotheliale Gewebe ein, wodurch Ödembildung und pro-inflammatorische Reaktionen gefördert werden [55]. Zudem vermitteln ICAM-1 und VCAM-1 durch die Aktivierung von Endothelzellen über intrazelluläre Signalkaskaden indirekt die Rekrutierung und Differenzierung von Immunzellen [58].

1.3.3 Gerinnungsfunktion

Koagulationsfaktoren vermitteln Reaktionen der Blutgerinnung und Auflösung von Gerinnseln innerhalb des menschlichen Blutgefäßsystems. Sie sind essentiell zur Versorgung von Verletzungen des Gefäßsystems, zur Perfusionsregulation sowie bei der Signaltransduktion von pro-inflammatorischen Reaktionen. Die im Rahmen der vorliegenden Versuche untersuchten Zielgene aus dieser Proteingruppe sind der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (engl. plasminogen activator inhibitor type 1, PAI-1), der von Willebrand-Faktor (engl. von Willebrand factor, vWF) und der Gewebefaktor (engl. tissue factor, TF).

PAI-1 wirkt als Hemmstoff der Blutgerinnungsauflösung, der sogenannten Fibrinolyse, im menschlichen Blutgefäßsystem. Dabei hat PAI-1 eine direkte hemmende Wirkung auf Proteine, die Gerinnsel effektiv auflösen wie z.B. Urokinase oder den gewebespezifischen Plasminogenaktivator (engl. tissue plasminogen activator, t-PA) [59,60]. Diese Proteine aktivieren die Protease Plasminogen und wandeln sie in Plasmin um. Plasmin baut Fibrinketten zu Fibrinogen ab und löst somit letztlich den stabilen „Fibrinthrombus“ auf. PAI-1 liegt in aktivierter Form sowohl in Granula der Thrombozyten als auch in Endothelzellen vor.

Auch vWF befindet sich sowohl in Thrombozyten innerhalb aktivierbarer Granula als auch in der subendothelialen extrazellulären Matrix von Endothelzellen. vWF spielt eine entscheidende Rolle in der Initiierung der zellulären Gerinnungskaskade, indem er Thrombozyten über spezielle Oberflächenrezeptoren, die Glykoproteine Ib, IIb und IIIa miteinander verbindet und somit einen sogenannten „Plättchenthrombus“ bildet [61]. Im Bereich der plasmatischen Gerinnung stabilisiert der vWF den Gerinnungsfaktor VIII, welcher in aktiviertem Zustand und in Verbindung mit dem Gerinnungsfaktor IXa die Thrombokinase (Faktor Xa) aktiviert. Der freigesetzte Faktor Xa spaltet anschließend Fibrinogen zu Fibrin und bereitet somit den Weg zur Bildung eines stabilen „Fibrinthrombus“ [62].

Der TF ist ein transmembranöser Zellmembran-Rezeptor, welcher sich im subendothelialen Gewebe befindet. In Verbindung mit anderen Gerinnungsfaktoren wie Faktor VIIa katalysiert er die Bildung von aktivierter Thrombokinase Xa [63]. Die Freilegung von TF durch eine Verletzung des Gefäßes mit Kontaktbildung zwischen subendotheliale Gewebe und Bestandteilen der plasmatischen Gerinnung ist hierfür maßgebend. Weiterhin wird TF durch pro-inflammatorische Zytokine aktiviert und steuert die Differenzierung und Proliferation von Leukozyten. Auch die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) sowie die Inhibierung der Auslösung eines programmierten Zelltods, der sogenannten Apoptose, sind wichtige Funktionen dieses Rezeptorproteins [64].

1.3.4 Entstehung eines pro-inflammatorischen Phänotyps

Pro-inflammatorische Botenstoffe spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion im menschlichen Organismus. Dabei interagieren viele dieser Botenstoffe mit endothelialen Zellen oder werden direkt vom Endothel sezerniert, um umliegende Immunzellen und Gewebe zu aktivieren [65–67]. In der vorliegenden Arbeit wurden als Vertreter dieser Gruppe Interleukin 1 β (engl. interleukin 1 β , IL-1 β), IL-6 und der Tumor-Nekrose-Faktor α (engl. tumor necrosis factor α , TNF- α) betrachtet.

IL-1 β spielt eine zentrale Rolle bei der Ausbildung von Fieber, indem es die Bildung von Prostaglandinen in Endothelzellen vermittelt [68]. Endothelzellen selbst sezernieren im aktivierten Zustand IL-1 β und sind damit direkt an der Rekrutierung und Differenzierung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und anderen Immunzellen beteiligt. IL-1 β fördert die Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche des Endothels und unterstützt damit den Vorgang der Diapedese [69]. Zudem induziert das Zytokin die Freisetzung von IL-6 und Glukokortikoiden [70].

IL-6 steigert, ähnlich wie IL-1 β , die Differenzierung und Proliferation von Leukozyten, insbesondere B- und T-Lymphozyten aber auch neutrophilen Granulozyten, und wird sowohl von Endothelzellen ausgeschüttet als auch für deren Aktivierung benötigt [71]. Durch die Anwesenheit von IL-6 wird ebenfalls die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 gesteigert [72,73]. Besonders im späteren Verlauf einer pro-inflammatorischen Reaktion ist IL-6 für die Aufrechterhaltung von Fieber verantwortlich [74]. Das Zytokin vermittelt die Freisetzung von Stresshormonen wie Glukokortikoiden, Somatotropin, Glukagon und Adrenalin [75].

TNF- α ist ein stark pro-inflammatorisch wirkendes Zytokin, welches vor allem von Makrophagen und aktivierten Endothelzellen synthetisiert und sezerniert wird [76]. Es wirkt migrationsfördernd auf Leukozyten [77], stimuliert deren Rekrutierung aus dem Knochenmark

und steigert die Proliferationsrate der Immunzellen [78–80]. TNF- α stimuliert analog zu IL-1 β und IL-6 die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, fördert die Bildung von Akute-Phase-Proteinen in der Leber und ist an der Aufrechterhaltung von Fieber beteiligt [81]. TNF- α ist ein starker Aktivator für Endothelzellen und bewirkt: (1) die Steigerung der Expression von Adhäsionsmolekülen [82], (2) die Lösung von Zell-Zell-Verbindungen zur Förderung des parazellulären Stofftransportes [83] und (3) die Förderung der Synthese von prothrombotischen Faktoren wie vWF und TF. Gleichzeitig wird TNF- α von aktivierten Endothelzellen ausgeschüttet, um autokrine und parakrine Effekte auf Immunzellen des Blutes und benachbarte Endothelzellverbände auszulösen [84].

1.3.5 Zellproliferation und -differenzierung

Proliferations- und Differenzierungsfaktoren steuern die Entwicklung und Reifung verschiedenster Zelltypen im menschlichen Organismus. Ein wichtiges Glykoprotein, welches vor allem für die Proliferation von myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark und deren Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten und Makrophagen verantwortlich ist, ist der Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (engl. granulocyte monocyte colony stimulating factor, GM-CSF) [85]. Er wird vorrangig von dendritischen Zellen, Monozyten und Endothelzellen sezerniert und über Blutgefäße weitertransportiert [86,87]. Bei adulten Immunzellen stimuliert GM-CSF die Migration in Gewebe und fördert in Endothelzellen die Expression von Selektinen und anderen Adhäsionsmolekülen [88]. Außerdem fördert es über TNF- α in „Fresszellen“ die Effektivität der Phagozytose [89].

1.3.6 Chemokine

Chemokine sind körpereigene lösliche oder zellmembrangebundene Signalproteine, welche eine gezielte Migration von verschiedenen Zellen bewirken. Dieser Bewegungsprozess wird Chemotaxis genannt. Dabei bewegen sich Zellen, z.B. Immunzellen, entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der größten Chemokinkonzentration. Eine zentrale Rolle spielen Chemokine bei der gezielten Bewegung von weißen Blutkörperchen aus dem Blut in entzündete Gewebe. Chemokine werden in erster Linie von phagozytierenden Immunzellen und Endothelzellen sezerniert, um den Ort einer inflammatorischen Reaktion im Körper für das Immunsystem zu markieren [90–92]. In den vorliegenden Versuchen wurden IL-8 und MCP-1 untersucht. IL-8 fördert speziell die Migration neutrophiler Granulozyten in Richtung des entzündeten Gewebes [93], indem es u.a. die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 stimuliert. Es wird besonders von Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten produziert und sezerniert [94,95]. Gleichzeitig hat IL-8 eine pro-angiogenetische Wirkung auf Endothelzellen

[96,97]. Es lässt diese in Gewebe einsprießen und fördert die Ausbildung neuer Kapillarstrukturen. MCP-1 ist ein Chemokin, welches hauptsächlich von Monozyten, T-Zellen und dendritischen Zellen produziert und sezerniert wird [98]. Es stellt einen wichtigen Botenstoff für Monozyten, Makrophagen und basophile Granulozyten dar [99,100]. MCP-1 wird zusätzlich auf Osteoklasten und in neuronalem Gewebe exprimiert [101].

1.4 Einfluss von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (PUFA) auf die Inflammation

Fettsäuren gehören als Bestandteile von Fetten zu den täglichen Komponenten einer ausgewogenen Ernährung. Man unterscheidet hierbei zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Ungesättigte Fettsäuren besitzen im Gegensatz zu gesättigten Fettsäuren mindestens eine C=C-Doppelbindung. Enthält eine Fettsäure mehrere dieser C=C-Doppelbindungen, wird sie als mehrfach-ungesättigte Fettsäure (engl. polyunsaturated fatty acid, PUFA) bezeichnet. Einige dieser PUFA können vom menschlichen Körper nicht aus einzelnen Komponenten zusammengesetzt werden und müssen daher von außen über die Nahrung zugeführt werden. Zu diesen „essentiellen“ PUFA gehören die Omega-3-Fettsäure α -Linolensäure (engl. α -linolenic acid, LNA; C18:3n3) sowie die Omega-6-Fettsäuren Linolensäure (engl. linoleic acid, LA; C18:2n6) und Arachidonsäure (engl. arachidonic acid, AA; C20:4n6). In der aus der Lebensmittelchemie stammenden Nomenklatur ungesättigter Fettsäuren steht „Omega“ für das Ende der Kohlenstoffkette, welches der Carboxygruppe gegenübersteht. Der Buchstabe „n“ in Omega-n-Fettsäuren bezeichnet die Position derjenigen Doppelbindung in der Kohlenstoffkette der Fettsäure, welche dem „Omega-Ende“ am nächsten ist. Diese Position bestimmt den Subtyp der Omega-n-Fettsäure.

PUFA sind am Aufbau von Zellmembranen beteiligt und wirken sich auf den Cholesterinspiegel und auf entzündliche Prozesse aus [102,103]. Hierbei wirken PUFA über mehrere Mechanismen: (1) Veränderung der Zusammensetzung von Phospholipiden der Plasmamembran [104–106], (2) Veränderung der Fluidität der Zellmembran [107], (3) Beeinflussung von membran-assoziierten Lipid-Raft-Strukturen [108,109], (4) Beeinflussung von Rezeptorfunktionen [110,111] und (5) Synthese von Lipid-Mediatoren wie Prostaglandinen [112,113].

1.4.1 Omega-3-Fettsäuren

Omega-3-Fettsäuren sind Ausgangsstoffe für die Synthese von Serie-III-Prostaglandinen wie dem Prostaglandin E_3 (engl. prostaglandin E_3 , PGE_3) [114]. Serie-III-Prostaglandine vermitteln pro-inflammatorische Effekte, allerdings ist ihre entzündungsfördernde Wirkung deutlich

schwächer als die von Serie-II-Prostaglandinen, die zumeist aus Omega-6-Fettsäuren entstehen [115,116]. Daher wird Omega-3-Fettsäuren eine entzündungshemmende Wirkung nachgesagt. In der Tat zeigten sich bei Omega-3-Fettsäure-basierten Diätmodellen vorteilhafte Effekte hinsichtlich Outcome bei kardiovaskulären Erkrankungen sowie der Rate bestimmter Tumorerkrankungen [117–119]. In Bezug auf die zelluläre Immunreaktion von Monozyten und Makrophagen wurde unter Omega-3-Fettsäuren eine Dämpfung der Stimulations-induzierten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α und IL-1 β , festgestellt [120,121]. Auch die Aktivität von Zersetzungsenzymen, wie Myeloperoxidase oder Lysozym, welche während der Phagozytose eine wichtige Rolle spielen, war in Anwesenheit von Omega-3-Fettsäuren vermindert [122,123]. Bei Endothelzellen konnte ein hemmender Einfluss auf die Zytokin-induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und VCAM-1, durch die fünffach-ungesättigte Eikosapentaensäure (engl. eicosapentaenoic acid, EPA; C20:5n3) und die sechsfach-ungesättigte Dokosahexaensäure (engl. docosahexaenoic acid, DHA; C22:6n3) auf Ebene der Transkription wie auch der Translation beobachtet werden [124,125]. Zudem wurde unter Supplementierung von EPA ein fördernder Effekt auf die endotheliale Produktion von Zytokinen, wie IL-6, IL-8 und GM-CSF beschrieben [126]. Zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Omega-3-Fettsäuren zählt neben EPA und DHA auch LNA.

1.4.2 Omega-6-Fettsäuren

Omega-6-Fettsäuren sind Ausgangsstoffe für die Synthese von stark pro-inflammatorischen Serie-II-Prostaglandinen wie Prostaglandin E₂ (engl. prostaglandin E₂, PGE₂) oder Prostaglandin I₂ (engl. prostaglandin I₂, PGI₂). Serie-II-Prostaglandine bewirken im Gewebe eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität [127], steigern die Reizweiterleitung von A δ - und C-Nervenfasern im Rahmen der Schmerzempfindung [128,129] und sind maßgeblich an der Induktion und Aufrechterhaltung von Fieber beteiligt [130,131]. Zudem bewirken Prostaglandine dieses Subtyps eine Reduktion der Magensäureproduktion [132], eine Durchblutungssteigerung des hepatischen und renalen Kreislaufs [133] sowie eine Bronchodilatation [134]. Vor diesem Hintergrund wird angenommen, dass ein hohes Omega-6/Omega-3-Verhältnis sich ungünstig auf entzündliche Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Arteriosklerose, Sepsis, Neoplasien und Fettleibigkeit auswirkt [135–140]. Den pro-inflammatorischen Effekten der Serie-II-Prostaglandine stehen Beobachtungen anti-inflammatorischer Wirkungen von Omega-6-Fettsäuren gegenüber. So wurde bei Endothelzellen durch AA ein hemmender Effekt auf die Zytokin-induzierte Steigerung der Genexpression von Adhäsionsmolekülen beobachtet [141]. Bei Makrophagen fördert AA ebenso wie DHA die Differenzierung zum Phagozytose-aktiven M2-Typ [142]. Offenbar besteht ein positiver Zusammenhang zwischen dem Anteil

ungesättigter Fettsäuren innerhalb der Plasmamembran von Immunzellen und deren Phagozytoseaktivität [143,144]. Weiterhin wurde für den Signaltransduktionsweg des proinflammatorischen Toll-like-Rezeptor 4 (engl. toll-like receptor, TLR4) sowie den nukleären Transkriptionsfaktor „Kappa-Leichtketten-Verstärker“ aus aktivierten B-Zellen (engl. nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells, NF- κ B) übereinstimmend ein hemmender Effekt von Omega-3- wie auch Omega-6-Fettsäuren beschrieben [145,146]. Zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Omega-6-Fettsäuren zählt neben AA auch LA.

2 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich der absoluten Quantifizierungsmethodik ddPCR mit dem bereits seit Jahren etablierten relativen Quantifizierungsverfahren qRT-PCR. Die zentralen Fragestellungen der Arbeit lauten:

1. Sind die Daten von qRT-PCR und ddPCR vergleichbar? In welcher Weise korrelieren die Ergebnisse von qRT-PCR und ddPCR miteinander?
2. Ist eine der beiden verwendeten Methoden der jeweils anderen in bestimmten Punkten über- oder unterlegen?

Um dieses Ziel zu erreichen, wird eine differenzierte Genexpressionsanalyse auf Grundlage inflammatorisch stimulierter humaner Endothelzellen (Sepsismodell) parallel mit beiden Quantifizierungsmethoden durchgeführt. Hierbei sollen durch strikte Angleichung der Rahmenbedingungen beider Verfahren aussagekräftige Daten gewonnen werden, auf deren Basis Empfehlungen zum Einsatz von qRT-PCR und ddPCR abgeleitet werden können. Dies wird umgesetzt durch: (1) Verwendung identischer Proben, (2) Nutzung identischer Primerpaare und standardisierter Thermozykler-Programme und (3) Anwendung kongruenter statistischer Verfahren. Darüber hinaus liefert die vorliegende Arbeit umfassende Daten bezüglich der Änderungen der Genexpression mikrovaskulärer Endothelzellen im pro-inflammatorischen Milieu unter Fokussierung auf Zielgene, welche im Rahmen eines entzündlichen Prozesses zentrale Rollen innerhalb der endothelialen Reaktionskaskade einnehmen.

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
8-Kanal-Multipipette Acura® manual 855	Socorex Isba S.A., Ecublens, Schweiz
8-Kanal-Multipipette Pipet-Lite L8 50XLS+	Mettler-Toledo Rainin, LLC, Greifensee, Schweiz
48-Well PCR-Cycler MiniOpticon real-time PCR detection	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
96-Well PCR-Cycler BioRad C1000 Touch™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Abzug Typ TA 1200v900-900	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Biometra UNO-Thermoblock RS232	Biometra GmbH, Göttingen
Bunsenbrenner Fuego SCS	WLD Tec GmbH, Göttingen
Kohlenstoffdioxid (CO ₂)-Inkubator B6060	Kendro Laboratory Produkts GmbH, Hanau
Elektrophoresenetzgerät E143	CONSORT nv, Turnhout, Belgien
Gefrierschrank MDF-U5386S-PE	Panasonic Marketing Europe GmbH, Hamburg
Gelelektrophoresekammer Compact S Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Biometra GmbH, Göttingen
Inverses Mikroskop: Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank GNP 2613 Comfort NoFrost	Liebherr GmbH, Bulle, Schweiz
Kühltransportbehälter	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Klasse II MSC-Advantage 0,9	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Mikrowelle MW 721	Clatronic International GmbH, Kempen
Photoreader BioDoc-IT Imaging System	Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK
Plattenreader Infinite M200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Pipette 0,5-10 µl Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 2-20 µl Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 10-100 µl Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 100-1000 µl Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet pro	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim
PX1™ PCR Plate Sealer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
QX200™ Droplet Digital™ PCR System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Skyline Orbital Shaker ELMI S-3.02 10L Analog 10 mm Amplitude	ELMI Ltd., Riga, Lettland
Spektrophotometer NanoVue	GE Healthcare GmbH, Solingen
Tischzentrifuge Sprout™	Heathrow Scientific, Illinois, USA
Ultratiefkühlschrank Forma 905 -86°C ULT Freezer	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
Vortexmischer Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wasserbad WNB 7	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Well-Platten-Zentrifuge Perfect Spin P	VWR International GmbH, Erlangen

Bezeichnung	Hersteller
Zählkammer Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
Zentrifuge Heraeus Fresco 17 Centrifuge Refrigerated	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
Zentrifuge Thermo Scientific Heraeus Multifuge 1S-R	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
0,5 ml Reaktionsgefäße mit Deckel Typ SafeFit	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
1,5 ml Reaktionsgefäße mit Deckel Typ SafeFit	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
6-well Platten TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
8er Multiply-µStrip, 0,2 ml Kette, Farbmix	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
48-well PCR-Platten Multiplate Low-Profile	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
48-Well Unskirted PCR Plates	
75 cm ² Zellkulturflaschen, 250 ml, PS, Filter-Schraubverschluss rot, transparent, Cellstar TC, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-well PCR-Platten Eppendorf twin.tec [®] , semi-skirted, 250 µl, farblos	Eppendorf AG, Hamburg
96-well PCR-Platten Multiplate Low-Profile	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
96-Well Unskirted PCR Plates	
96-well Platten Zellkultur Mikroplatte, 96 Wells, PS, F-Boden, Kaminform, weiß, Cellstar TC, Abdeckplatte mit Kondensationsringen, steril, 8 Stück/Beutel	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
DG8™ Cartridges für QX200™/QX100™ Droplet Generator	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
DG8™ Gaskets für QX200™/QX100™ Droplet Generator	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Handschuhe Latex Sempercare Premium Handschuh, puderfrei, unsteril, Naturlatex	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
Handschuhe Nitril Vasco Nitril white	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kryoröhrchen Cryo.s, 2 ml, runder Boden, Innengewinde	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PCR-Folie 96-Well Microseal B Adhäsive Seals	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PCR-Platten Heat Seal- Folie, durchstechbar	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Petrischalen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pipettenspitzen 0,1-20 µl Biosphere Fil. Tip 20 farblos	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 2-100 µl Biosphere Fil. Tip 100 farblos	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µl GreenPak™, Filter	Mettler-Toledo Rainin, LLC, Greifensee, Schweiz
Pipettenspitzen 1000 µl Multiguard Barrier Tips	Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, USA

Bezeichnung	Hersteller
Serologische Pipetten 5 ml Pipettes, CELLSTAR, 5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten 10 ml Pipettes, CELLSTAR, 10 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten 25 ml Pipettes, CELLSTAR, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäß Biosphere SafeSeal Tube 1.5 ml	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
Zellschaber TPP-Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen, 15 ml, konisch, Falcon™	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
Zentrifugenröhrchen, 50 ml, konisch, Falcon™	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA

3.1.3 Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
1 % Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
70 % Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
100 % Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl-Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
α-Tocopherol DL- α- Tocopherol BioChemica	AppliChem GmbH, Darmstadt
Aqua destillata (Aqua dest.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ddPCR™ Droplet Reader Oil	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
DNA-Leiter peqGOLD DNA-Leiter Mix 0,1-10 kb	VWR International GmbH, Erlangen
DNase I RNase-free, 2000 U (Units)/ml	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)
DNase I Reaktions-Puffer RNase-free	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (Main)
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Ladepuffer CoralLoad PCR Buffer, 10x	QIAGEN GmbH Germany, Düsseldorf
Lysis Solution Torpedo Ringer	STRATEC Molecular GmbH, Berlin
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)/2 % Fetales Kälberserum (FKS) - Lösung	Provitro AG, Berlin
PBS-Puffer	Provitro AG, Berlin
PCR-Supermix PerfeCTa SYBR Green FastMix	Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, USA
Positiv-Kontrolle human heart aorta total RNA	Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
α-Linolensäure	Matreya LLC, State College, USA
Arachidonsäure	Matreya LLC, State College, USA
Dokosahexaensäure	Matreya LLC, State College, USA
Eikosapentaensäure	Matreya LLC, State College, USA
Linolsäure	Matreya LLC, State College, USA
Quanta qScript® cDNA Supermix	Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, USA
QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
QX200™ Droplet Generation Oil for EvaGreen	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Rekombinantes humanes IFN-γ	PeproTech Germany, Hamburg
Rekombinantes humanes IL-1β	PeproTech Germany, Hamburg
Rekombinantes humanes TNF-α	PeproTech Germany, Hamburg
RNase-freies Wasser (Aqua ad iniectionem, Aqua a.i.) Water Molecular Biology Reagent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Bezeichnung	Hersteller
Zell-Färbungs-Puffer	Provitro AG, Berlin
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) - Acetat - Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) - Puffer (TAE-Puffer)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau Trypan Blue solution, 0.4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA Trypsin-Lösung, 0,5 g/l porkines Trypsin und 0,2 g/l EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zellkulturmedium Microvascular endothelial cell growth medium, basal, phenol red free, angereichert mit rekombinantem humanem vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (rhVEGF, 5 ng/ml), rekombinantem humanem epidermalem Wachstumsfaktor (rhEGF, 5 ng/ml), rekombinantem humanem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (rhFGF, 5 ng/ml), rekombinantem humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor 1 (rhIGF-1, 15 ng/ml), L-Glutamin (10 mmol/l), Heparinsulfat (0,75 U/ml), Hydrokortison-Hemisuccinat (1 µg/ml), Ascorbinsäure (50 µg/ml), FKS (5 %) und Blastidin (12,5 µg/ml)	Provitro AG, Berlin

3.1.4 Zelllinie

Bezeichnung	Hersteller
Zelllinie TIME ATCC® CRL-4025™	American Type Culture Collection, Wesel

3.1.5 Kits

Bezeichnung	Hersteller
InviTrap Spin Universal RNA Mini Kit	STRATEC Molecular GmbH, Berlin
RealTime-Glo MT Cell Viability Assay	Promega, Mannheim

3.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Zielgen	Annealing-Temperatur	Produkt-Größe	Elongationszeit	Sequenzen (Sense / Antisense)
18S	55 °C	101 bp	20 sec	GCATATGCTTGTCTCAAAGA / CCAAAGGAACCATAACTGAT
ACE1	57 °C	187 bp	20 sec	AGCCCTCTCAGTGTCTACGC / CTCCTTGGTGATGCTTCCAT
ACTB	56 °C	112 bp	20 sec	GCACAGAGCCTCGCCTT / CCTTGACATGCCGGAG
Adra1b	57 °C	195 bp	20 sec	TCACGAGGACACCCTTAGCA / GGCTTCAGGGTGGAGAACAA
Adra1d	57 °C	150 bp	20 sec	TTCTTCTTTGTCCTGCCGCT / GAAGGCGCGCTTGAAGCTC

Zielgen	Annealing-Temperatur	Produkt-Größe	Elongationszeit	Sequenzen (Sense / Antisense)
Adrb2	61 °C	173 bp	20 sec	TGCTGACCAAGAATAAGGCC / AATGGCATAGGCTTGGTTTCGT
ATIP1	55 °C	173 bp	20 sec	AAGCATTTCGTCCAGCAGC / AGAGGTTTCATGCGCAGC
ATRAP	65 °C	196 bp	20 sec	GAGTCCTGGTCCACACTG / TAGAACGACCTCCCAGGCA
EdnrA	62 °C	195 bp	20 sec	AACGAGATGGACAAGAACCGATGT / GACCGAGGTCATCAGACTTTTGA
EdnrB	59 °C	200 bp	20 sec	TGCTTGCTTCATCCCGTTCA / ACTTCCCGTCTCTGCTTTAGG
GM-CSF	60 °C	141 bp	20 sec	CCATGATGGCCAGCCACTAC / CTGGCTCCCAGCAGTCAAAG
ICAM-1	60 °C	116 bp	10 sec	CTGATGGGCAGTCAACAGCTA / GCAGCGTAGGGTAAGGTTCT
IL-1 β	66 °C	163 bp	20 sec	ACGCTCCGGGACTCACAGCA / TGAGGCCCAAGGCCACAGGT
IL-6	56 °C	106 bp	10 sec	AAGCCAGAGCTGTGCAGATG / CTGGCATTGTGGTTGGGTC
IL-8	56 °C	197 bp	20 sec	CCTGATTCTGCAGCTCTGTG / CCAGACAGAGCTCTTCCAT
MCP-1	61 °C	100 bp	10 sec	GTCTCTGCCGCCCTTCTGTGC / AACAGCAGGTGACTGGGGCA
PAI-1	54 °C	202 bp	20 sec	CAGACCAAGAGCCTCTCC / ATCACTTGGCCCATGAAAAG
TF	60 °C	177 bp	20 sec	CACAGAGTGTGACCTCACCG / ATTGTTGGCTGTCCGAGGTT
TNF- α	60 °C	54 bp	20 sec	AGTTGTGTCTGTAATCGCCCTAC / CTAAGCAAACTTTATTCTCGCC
VCAM-1	58 °C	199 bp	20 sec	AGTCCCTGGAACCAAGAGT / TGCAGCTTTGTGGATGGATT
vWF	61 °C	167 bp	20 sec	GGCAATTCCTCCTCCACAAAC / CAGTTGACCCGATGACTCTTCA

3.1.7 Software und Datenbanken

Bezeichnung	Hersteller
BioRad CFX-Manager™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
GeneRunner	HelioGenetics Inc, New Jersey, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Kalifornien, USA
i-control™ Microplate Reader Software	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Microsoft®-Excel™ 2010	Microsoft Deutschland GmbH, München
Microsoft®-Word™ 2010	Microsoft Deutschland GmbH, München
Nukleotiddatenbank des Nationalen Zentrums für Biotechnologie Informationen	National Center for Biotechnology Information NCBI, Maryland, USA
QuantaSoft™ Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

3.2 Methodik

3.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Lieferanten (American Type Culture Collection, ATCC, Wesel, Deutschland, CRL-4025™) [26]. Zu Beginn wurde die Arbeitsfläche unter der Sterilbank ordnungsgemäß gereinigt und desinfiziert. Alle Arbeiten erfolgten unter laufender Absaugung und sterilen Kautelen. Die mit 20 ml basalem Zellkulturmedium befüllten Zellkulturflaschen wurden für 30 Minuten im Brutschrank äquilibriert. Im nächsten Schritt erfolgte die Übertragung von jeweils $5 \cdot 10^5$ Zellen in die Zellkulturflaschen und anschließend eine Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre. Nach jeweils 48 Stunden wurde ein Teilmedienwechsel durchgeführt. Hierbei wurde 15 ml altes Kulturmedium entfernt und durch 15 ml neues äquilibriertes Kulturmedium ersetzt. Bei der Zellernte wurde das gesamte Kulturmedium abpipetiert und anschließend mit 8 ml PBS-Puffer gespült. Die Spüllösung wurde verworfen. Die adhärennten Zellen wurden mit 4 ml Trypsin-EDTA gelöst. Die gewonnene Zelllösung wurde in Zentrifugenröhrchen überführt, mit 3 ml PBS/2%FKS gespült und 10 Minuten bei 250 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml PBS/2%FKS resuspendiert. Die anschließende Zellzählung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden zunächst 10 µl Trypanblau auf die seitliche Fläche der Zählkammer gegeben und anschließend mit 10 µl Zellsuspension gemischt. Nach Aufbringen eines Deckglases wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop in allen 4 Großquadranten diagonal jeweils 4 Kästchen mithilfe des aufgetragenen Gittermusters ausgezählt. Aus der gezählten Zellzahl ergab sich durch Einsatz folgender Formel die Zellzahl pro µl:

$$(1) \quad \text{Zellzahl} / \mu\text{l} = \frac{\text{Gezählte Zellzahl}}{\text{Gezählte Oberfläche [mm}^2\text{]} * \text{Kammertiefe [mm]} * \text{Verdünnung}}$$

Für die nachfolgenden PCR-Versuche wurden je $1 \cdot 10^6$ Zellen in Eppendorf-Gefäße überführt und anschließend für 5 Minuten bei 240 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden zur Vorbereitung für die im weiteren Verlauf zu erfolgende RNA-Isolation mit 700 µl Lysis Solution Torpedo Ringer + 1% Mercaptoethanol versetzt und bei - 80°C gelagert.

Die hier beschriebenen Arbeitsschritte wurden durch folgende Mitglieder des Forschungsteams der Anästhesie und operativen Intensivmedizin unterstützt: Simon Trommer, Anja Leimert, Claudia Rößler und Melanie Cieselski.

3.2.2 Zell-Stimulation und -Supplementierung

In der vorliegenden Dissertation wurden Versuche mit zwei verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Ansatz 1 beinhaltete eine Stimulation der Zellen mittels der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und Interferon γ (engl. interferon γ , INF- γ). Die Zellen wurden mit einem Gemisch dieser Zytokine in einer Konzentration von je 100 ng/ml für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrollgruppe diente eine parallele Zellkultur, die in Abwesenheit der Zytokine inkubiert wurde. Ansatz 2 beinhaltete die Supplementierung der Zellen für 144 Stunden mit PUFA in Kombination mit einer Stimulation mittels der Zytokine TNF- α , IL-1 β und INF- γ in einer Konzentration von je 5 ng/ml in den letzten 24 Stunden der Fettsäuresupplementierung. Aus der Familie der Omega-3-Fettsäuren wurden LNA, EPA und DHA verwendet. Als Repräsentanten der Omega-6-Fettsäuren wurden LA und AA eingesetzt. Trägersubstanz für die Fettsäuren stellte 0,1 Vol.-% Ethanol dar. Die Konzentration der PUFA im Kulturmedium betrug 15 μ mol/l. Jeweils eine der genannten Fettsäuren wurde dem Kulturmedium einer Zellkulturflasche hinzugefügt. Als Kontrollen dienten parallele Zellkulturen, die (1) in Abwesenheit der Zytokine bzw. (2) in Abwesenheit von Zytokinen und Fettsäuren kultiviert wurden. Den Kontrollen ohne PUFA-Supplementierung wurde 0,1 Vol.-% Ethanol zugesetzt. Die hier beschriebenen Arbeitsschritte wurden durch folgende Mitglieder des Forschungsteams der Anästhesie und operativen Intensivmedizin unterstützt: Simon Trommer, Anja Leimert, Claudia Rößler und Melanie Cieselski.

3.2.3 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellviabilität der TIME wurde mittels RealTime-Glo MT Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, Germany) bestimmt, um eventuelle Einflüsse der Zytokinstimulation und der Fettsäuresupplementierung auf das Zellüberleben aufzuzeigen. Die Handhabung und Auswertung des Assays erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers [147]. Es wurde für die vorliegende Arbeit das Endpunkt-Format gewählt. Dies bedeutet, dass die Zellen wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben in 96-Well-Platten stimuliert und supplementiert wurden und anschließend die Analyse der zellulären Viabilität erfolgte. Hierzu wurden die Zellen 4 Stunden vor Beendigung der Stimulations- und Supplementierungsphase mit 25 μ l Mastermix Viability Reagent, bestehend aus Zellkulturmedium, MT Cell Viability Substrat und NanoLuc[®] Luciferase, behandelt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte jeweils nach 1 Stunde sowie nach 4 Stunden fortgesetzter Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ am Plattenreader „Infinite M200“. Bei dem hier verwendeten Viabilitäts-Assay handelt es sich um eine biolumineszente Methode, welche das Zellüberleben durch eine metabolische Reaktion von vitalen Zellen und die anschließende Messung eines Lumineszenzsignals ermittelt. Hierzu dienten die im Assay

enthaltene NanoLuc® Luciferase und ein zellpermeables Prosubstrat, das MT Cell Viability Reagent. Vitale Zellen waren im Gegensatz zu toten Zellen in der Lage dieses Prosubstrat in ein Substrat für die NanoLuc® Luciferase umzuwandeln. Das hierdurch ausgesendete Lumineszenzsignal wurde mittels eines Infinite M200 Plate Reader erfasst und durch die i-control™ Software analysiert, wobei die Stärke des ausgesendeten Signals mit der Anzahl der vitalen Zellen korrelierte. Die Bestimmung des Zellüberlebens erfolgte grafisch über die Analyse der Lumineszenzstärke pro Zeit. Aus dem Anstieg oder Abfall der Lumineszenz im linearen Bereich des Graphen ließ sich die Änderung der Zellviabilität bestimmen. Die hier beschriebenen Arbeitsschritte wurden durch folgendes Mitglied des Forschungsteams der Anästhesie und operativen Intensivmedizin unterstützt: Simon Trommer.

3.2.4 RNA-Isolation

Für die in den folgenden Schritten beschriebene Extraktion der RNA wurde das InviTrap Spin Universal RNA Mini Kit nach den Angaben des Herstellers (STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet [148]. Die entsprechend Abschnitt 3.2.1 gewonnenen Zell-Lysate wurden im Folgenden auf DNA-bindende Spin Filter pipettiert, die zuvor auf 2 ml Receiver Tubes (mit Verschlusskappe) platziert worden waren. Die Proben wurden für 1 Minute stehen gelassen und anschließend für 2 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Die DNA-bindenden Spin Filter wurden verworfen. Zu den Proben in den Receiver Tubes wurden 500 µl 70% Ethanol gegeben und vorsichtig auf- und abpipettiert. Die RNA-haltigen Proben wurden nun auf RNA-RTA Spin Filter übertragen, erneut für 1 Minute stehen gelassen und für 2 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die RNA-RTA Spin Filter wieder auf die entleerten Receiver Tubes gesetzt. Im nächsten Abschnitt erfolgten die Waschschrte. 600 µl Waschpuffer R1 wurden auf die RNA-RTA Spin Filter pipettiert und die Proben im Anschluss für 1 Minute bei 11000 x g zentrifugiert. Erneut wurden folgend der Durchfluss sowie die alten Receiver Tubes verworfen. Die RNA-RTA Spin Filter wurden auf neue Receiver Tubes gesetzt. Der zweite Waschschrte lief analog zum ersten, nur wurden hier 700 µl des Waschpuffers R2 verwendet. Dieser zweite Wasch-Prozess wurde im Anschluss noch einmal wiederholt. Ein letztes Mal wurde der Durchfluss verworfen und die RNA-RTA Spin Filter zurück auf die RTA Receiver Tubes gesetzt. Reste des 70%igen Ethanols wurden folgend durch eine 4-minütige Zentrifugation bei 17000 x g entfernt. Die Receiver Tubes wurden nun verworfen, während die RNA-RTA Spin Filter auf RNase-freie Elution Tubes gesetzt wurden. Je 100 µl Elutionspuffer R wurden direkt auf die Membranen der RNA-RTA Spin Filter gegeben und anschließend 2 Minuten inkubiert. Dann wurden die Proben für 1 Minute für 11000 x g zentrifugiert. Die RNA-RTA Spin Filter wurden verworfen und die ausgewaschenen RNA-Lösungen sofort bei -80°C

gelagert. Die hier beschriebenen Arbeitsschritte wurden durch folgende Mitglieder des Forschungsteams der Anästhesie und operativen Intensivmedizin unterstützt: Simon Trommer und Melanie Cieselski.

3.2.5 Bestimmung der RNA-Konzentration- und Reinheit

Die RNA-Konzentrationen und die Reinheit der Proben wurden mittels des Spektrophotometers NanoVue (GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland) bestimmt. Vor jeder Messung erfolgte nach den Anweisungen des Geräteherstellers eine gründliche Reinigung mit Aqua dest. und ein Nullabgleich mittels Aqua a.i.. Die Funktion „LifeScience“ wurde gewählt und anschließend erfolgte die Auswahl der Rubrik „RNA“. Anschließend wurden 1,5 µl der Probe auf den Applikationsort gegeben und die Messung gestartet. Das Ergebnis der RNA-Konzentration in µg/ml wurde auf dem integrierten Bildschirm angezeigt und per Knopfdruck ausgedruckt. Zur Bestimmung der Reinheit der RNA-Proben wurde eine spektrophotometrische Messung der Proben bei je 260 und 280 nm Wellenlänge durchgeführt. Ein ermitteltes 260/280-Verhältnis von ca. 2,0 wurde als Indikator für eine „reine“ RNA-Probe angesehen. Nach der letzten Probe wurde die Applikationsfläche erneut mit Aqua dest. gereinigt, der Probenkopf gesenkt und die beigelegte Schutzhülle um das Gerät gelegt.

3.2.6 cDNA-Synthese

Für die PCR-Untersuchungen wurden jeweils 1 µg Proben-RNA mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (engl. complementary desoxyribonucleic acid, cDNA) umgeschrieben. Um eventuell in den RNA-Proben enthaltene DNA-Reste zu eliminieren, wurde vorab ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurden in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen die RNA-Probe mit 1 µl DNase I und 1,4 µl DNase-Puffer gemischt und mit Aqua a.i. auf ein Endvolumen von 14 µl adjustiert. Die Inkubation erfolgte im Thermoblock für 10 Minuten bei 37°C und anschließend für 10 Minuten bei 75°C.

Für die Reverse Transkription der Proben wurden je 10 µl des DNase-Verdau zusammen mit 18 µl Aqua a.i. und 7 µl Quanta qScript cDNA Supermix in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert (Gesamtvolumen des Ansatzes: 35 µl). Weiterhin wurde als Kontrolle ein Nicht-Reverse-Transkriptase (engl. no reverse transcriptase sample, NRT)-Ansatz mittels eines durch Hitze inaktivieren cDNA Supermix (Inkubation für 5 Minuten bei 85°C) durchgeführt. Hierfür wurden je 4 µl DNase-Verdau, 7,2 µl Aqua a.i. und 2,8 µl hitzeinaktivierter Quanta qScript cDNA Supermix zusammen in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Die Proben wurden im Thermoblock langsam auf 25°C aufgeheizt und anschließend bei 42°C für 30 Minuten inkubiert. Die Beendigung der reversen Transkription durch hitzeabhängige Inaktivierung der beteiligten

Enzyme erfolgte bei 85°C für 5 Minuten. Die fertigen cDNA-Proben wurden bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Da für zwei verschiedene Amplifikationsverfahren cDNA-Proben benötigt wurden, fanden zwei identische Durchläufe der oben beschriebenen Ansätze für den DNase-Verdau und die daraufhin folgende reverse Transkription statt.

3.2.7 Primerkonstruktion und -Etablierung

Zur Konstruktion der benötigten Primerpaare für die folgenden Amplifikationsversuche mittels qRT-PCR und ddPCR wurde die Internetseite der Nukleotiddatenbank des Nationalen Zentrums für Biotechnologie Informationen (engl. National Center for Biotechnology Information, NCBI) genutzt [149]. Das gewünschte Zielgen wurde in das eingeblendete Suchfeld eingegeben und das passende Resultat ausgewählt. Im Falle mehrerer Transkriptvarianten wurde jenes mit der längsten Nukleotidsequenz gewählt, um alle weiteren Varianten des Zielgens zu berücksichtigen. Nun wurde die Option „Run BLAST“ ausgewählt. Diese Modifikation der Suchfunktion für die Boten-Ribonukleinsäure-Sequenz (engl. messenger ribonucleic acid, mRNA) des Zielgens beinhaltete einen Vergleich aller mRNA-Sequenzen der vorhandenen Transkriptvarianten. Hierzu musste zuvor die Zusatzfunktion „Align two or more sequences“ ausgewählt und anschließend die Akzessionsnummern, welche die anderen vorhandenen Transkriptvarianten des gewünschten Zielgens codieren, dem Feld „Enter Subject Sequences“ hinzugefügt werden. Daraufhin wurde mittels der Funktion „BLAST“ der gewünschte Vergleich aller Transkriptvarianten gestartet und folgend grafisch und schriftlich angezeigt. Die längste angezeigte Variante wurde nun ausgewählt und die dazugehörige mRNA-Sequenz angezeigt. Als Nächstes wurde die Funktion „pick primers“ genutzt, um für die gewählte mRNA-Sequenz passende Oligonukleotidprimer-Paare zu bilden. Die im Folgenden geöffnete Suchmaske erlaubte die Modifikation der Primer-Eigenschaften. Um eine hohe Spezifität der Primer zu gewährleisten wurde eine PCR-Produktlänge von 90-300 bp gewählt. Die maximale Schmelztemperatur-Differenz der Primer wurde so gering wie möglich gewählt, um eine möglichst effektive Amplifikation der gewünschten Sequenz des Zielgens, sowohl durch den Forward-Primer als auch durch den Reverse-Primer zu gewährleisten. Anschließend wurde die Funktion „Intron inclusion“ aktiviert. Mittels dieser Funktion wurde sichergestellt, dass Forward-Primer und Reverse-Primer durch mindestens ein Intron der korrespondierenden genomischen DNA-Sequenz getrennt sind. Bei mehreren Transkriptvarianten des Zielgens wurde zusätzlich die Reichweite der zu erstellenden Primer auf jene Sequenz eingegrenzt, welche alle Transkriptvarianten einschließt. Mittels der Aktion „get primers“ wurden nun die modifizierten Primer-Eigenschaften in die Suche mit einbezogen, wodurch anschließend bis zu 10 verschiedene mögliche Primerpaare mit den zugehörigen Nukleotidsequenzen

vorgeschlagen wurden. Diese Primervarianten für das gewünschte Zielgen wurden als nächstes mittels der Software „GeneRunner“ auf Temperaturbereiche von möglicher Schleifenbildung überprüft. Es wurden nur solche Primerpaare als suffizient ausgewählt, bei denen dieser Temperaturbereich und die Annealing-Temperatur der Primer weit auseinanderlagen. Nach Auswahl der geeigneten Primerpaare für die gewünschten Zielgene wurden diese bei Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bestellt. Bei Ankunft der Primer wurden diese in den Transport-Tubes kurz zentrifugiert und mit Aqua a.i. in Volumina nach Angaben des Herstellers gelöst. Anschließend erfolgte eine Durchmischung der Primer-Lösungen mittels Vortex und Lagerung bei -20°C. Zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperaturen der bestellten Primer-Paare sowie zum Ausschluss von eventuellen Nebenprodukten während der Amplifikation wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Vorbereitend wurden die gelieferten und gelösten Primer im Verhältnis 1:10 verdünnt. Anschließend wurde der Mastermix für die Gradienten-PCR angesetzt: Pro Well wurden je 12,5 µl PCR-Supermix „PerfeCTa SYBR Green FastMix“, 10,5 µl Aqua a.i. und 1 µl cDNA „human heart aorta“ zusammenpipettiert, mittels Vortex gemischt und kurz anzentrifugiert. Je 24 µl dieses Mastermixes wurden pro Well auf eine 48-Well-PCR-Platte vorgelegt. Nun wurden zu diesem Mastermix je 0,5 µl Sense- und Antisense-Primer pipettiert. Die PCR-Platten wurden daraufhin mit einer Microsealfolie abgedeckt und diese mittels eines Kunststoffschabers verschlossen. Anschließend erfolgte die Inkubation des Gradienten-Ansatzes im 48-Well PCR-Thermozykler entsprechend dem in Tabelle 1 dargestellten Programm. Die Dauer der Extension war hierbei abhängig von der Länge des PCR-Produktes und ergab sich aus dem Quotienten der Länge des PCR-Produktes in Basenpaaren und der Geschwindigkeit der verwendeten PCR-Polymerase (1kbp/Minute).

Tabelle 1: Programm der Gradienten-PCR

Schritt der Gradienten-PCR	Temperatur	Verweildauer	Zyklus-Anzahl
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	10 sec	45 Zyklen
Primer Annealing	$T_m \pm 5^\circ\text{C}$	30 sec	
Extension	72°C	X sec (abhängig von Länge des PCR-Produktes)	
Finale Extension	72°C	10 min	1 Zyklus
Finale Denaturierung	95°C	2 min	1 Zyklus
Schmelzkurve	65 - 95°C (in Temperaturschritten von je 0,5°C)	5 sec (je Temperaturschritt)	1 Zyklus

Verwendete Abkürzungen: Schmelztemperatur des verwendeten Primerpaars (T_m), Minuten (min), Sekunden (sec)

Zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse der Gradienten-PCR wurde im Anschluss eine Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate durchgeführt. Diese diente zum einen der Bestätigung der Spezifität der verwendeten Primer und zum anderen dem Abgleich der Produktgröße der PCR-Amplifikation mittels einer definierten Basenleiter. Zu Beginn erfolgte die Herstellung des Agarosegels. Dazu wurde 1 g Agarose in einen weithalsigen Erlenmeyerkolben gegeben und anschließend 100 ml TAE-Puffer hinzugefügt. Die so gebildete Suspension wurde schrittweise in der Mikrowelle erhitzt bis sich eine homogene Lösung ohne feste Bestandteile oder Schlieren ergab. Hierbei wurde auf das Tragen einer Schutzbrille und wiederholtes Schwenken der erhitzten Lösung mithilfe eines Gummigriffs geachtet. Anschließend wurde die Agaroselösung vorsichtig und unter Vermeidung von Blasenbildung in eine Gelkammer gegossen. Nun wurden die Kämmen in das noch flüssige Gel eingesetzt, die Kammer beschriftet und für 30 Minuten bei 4°C in den Kühlschrank gestellt. Daraufhin wurde das Agarosegel in die Elektrophoresekammer überführt und nach Entfernung der Kämmen vollständig mit TAE-Puffer bedeckt. Die Proben aus der Gradienten-PCR wurden mit je 6 µl CoralLoad Ladepuffer versetzt und der gesamte Inhalt der Wells in die Geltaschen pipettiert. In die äußerste Geltasche wurden zusätzlich 6 µl CoralLoad Ladepuffer und 5 µl DNA-Leiter „peqGOLD DNA-Leiter Mix“ 0,1-10 kb gegeben. Die dadurch gebildete definierte Basenleiter diente zur späteren Bestimmung der Produktgröße des Amplifikats der PCR. Nun wurde die Elektrophoresekammer mit 80 V Spannung versorgt und der Lauf regelmäßig beobachtet und kontrolliert. Nach abgeschlossenem Lauf wurde die Kammer inklusive Gel entnommen und der TAE-Puffer verworfen. Es folgte das Abtropfen des Gels und die Lagerung in einer großen Petrischale. Die nächsten Arbeitsschritte erfolgten unter dem Abzug und der Verwendung von speziellen Nitril-Schutzhandschuhen. Auf der Arbeitsfläche unter dem Abzug wurde das Gel in eine Schwenkwanne gelegt und mit Aqua dest. bedeckt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Gel bei den Bewegungen der Schwenkwanne nicht an dessen Boden haftete. Im Anschluss erfolgten die Hinzugabe von 7 µl Ethidiumbromid und eine 30-minütige Inkubation. Letztlich wurde das Ethidiumbromid-Wasser-Gemisch in einen unter dem Abzug befindlichen Kanister entsorgt und das Gel zweimal für je 15 Minuten mit Aqua dest. in der Schwenkwanne inkubiert. Im Anschluss an diese Färbeschritte wurde das Gel mittels des Photoreaders „BioDoc-IT Imaging System“ fotografiert und die Bildqualität optimiert. Am Schluss wurden sämtliche Arbeitsflächen und Geräte unter Berücksichtigung der Hygienebestimmungen gereinigt. Die hier beschriebenen Arbeitsschritte der Primerkonstruktion und -Etablierung wurden durch folgende Mitglieder des Forschungsteams der Anästhesie und operativen Intensivmedizin unterstützt: Simon Trommer, Claudia Rößler und Melanie Cieselski.

3.2.8 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Zunächst wurde der qPCR-Mastermix hergestellt. Pro benötigtem Well wurden hierzu 12,5 µl PCR-Supermix „PerfeCTa SYBR Green FastMix“, 10,5 µl Aqua a.i., 0,5 µl Sense-Primer und 0,5 µl Antisense-Primer zusammen in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Der hergestellte qPCR-Mastermix wurde anschließend mittels Vortex vermischt und kurz anzentrifugiert. Nun wurden je 24 µl des Mastermix in die Wells einer 96-Well Platte vorgelegt und je 1 µl cDNA-Probe hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde 1 µl Aqua a.i. und als Positivkontrolle 1 µl cDNA, generiert ausgehend von „human heart aorta total RNA“ (von Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), verwendet. Nach erfolgter Bestückung aller Wells wurde die 96-Well-Platte mittels einer Microseal-Folie abgedeckt und anschließend mit einem Kunststoffschaber versiegelt. Nach kurzer Zentrifugation der PCR-Platte mit einer Well-Platten-Zentrifuge erfolgte die Inkubation im PCR-Thermozykler mit Ablauf des PCR-Programms inklusive Schmelzkurve entsprechend Tabelle 2.

Tabelle 2: Programm der quantitativen Real-Time PCR

Schritt der qRT-PCR	Temperatur	Verweildauer	Zyklus-Anzahl
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	30 sec	45 Zyklen
Primer Annealing	Annealing-Temperatur des Primerpaares	20 sec	
Extension	72°C	Elongationszeit des Primerpaares	
Finale Extension	72°C	5 min	1 Zyklus
Finale Denaturierung	95°C	2 min	1 Zyklus
Schmelzkurve	65 - 95°C (in Temperaturschritten von je 0,5°C)	5 sec (je Temperaturschritt)	1 Zyklus

Verwendete Abkürzungen: Minuten (min), Sekunden (sec)

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mittels der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Die relative Quantifizierung basierte hierbei im Ansatz 1 auf dem Referenz- bzw. „Housekeeping“-Gen 18S rRNA und im Ansatz 2 auf dem Referenz- bzw. „Housekeeping“-Gen ACTB. Um Expressionsunterschiede zwischen den Proben und den Kontrollen zu berechnen, wurde zuerst die Differenz der CT-Werte („Schwellenwert-Zyklus“, engl. threshold cycle, bei dem das erzeugte Fluoreszenzsignal erstmalig die Hintergrundfluoreszenz deutlich übersteigt) von Ziel- und Referenzgenen gebildet:

$$(2) \quad \Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$$

Anschließend wurde die Differenz der ΔCT -Werte der behandelten Proben und der Kontroll-Proben berechnet:

$$(3) \quad \Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Behandlung}} - \Delta CT_{\text{Kontrolle}}$$

Für die letztliche Berechnung des Expressionsunterschieds zwischen behandelten Proben und Kontroll-Proben, also der relativen Quantifizierung (engl. relative quantification, RQ), wurde der erhaltene $\Delta\Delta CT$ -Wert in die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Formel eingesetzt:

$$(4) \quad RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Die zugehörigen CT-Werte der Proben für die jeweiligen PCR-Läufe wurden mittels der Analyse-Software „BioRad CFX-Manager“ angezeigt und für die folgenden Berechnungen in Microsoft®-Excel™-Tabellen eingefügt. Die weiteren Berechnungen anhand der oben beschriebenen Formeln erfolgten mittels Microsoft®-Excel™. RQ-Werte > 1 wurden als Indikator einer Hochregulation, Werte < 1 als Indikator einer Herunterregulation der Expression des betrachteten Zielgens von behandelten Proben gegenüber den Kontrollen angesehen. Die hier beschriebenen Arbeitsschritte wurden durch folgende Mitglieder des Forschungsteams der Anästhesie und operativen Intensivmedizin unterstützt: Simon Trommer und Melanie Cieselski.

3.2.9 Digitale Droplet PCR (ddPCR)

Zur Herstellung des ddPCR-Mastermix wurden je 11 μl QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix, 5,6 μl Aqua a.i., 2,2 μl Sense-Primer und 2,2 μl Antisense-Primer zusammen in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Der ddPCR-Mastermix wurde mittels Vortex vermischt und kurz anzentrifugiert. Nun wurden je 21 μl des Mastermix in die Tubes der 8er Combi-Reaktionsgefäße vorgelegt. Anschließend wurde zum vorgelegten Mastermix je 1 μl cDNA-Probe hinzugefügt. In Analogie zur qRT-PCR wurden als Negativkontrolle Aqua a.i. und als Positivkontrolle cDNA, generiert ausgehend von „human heart aorta total RNA“ (von Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), eingesetzt. Von den fertigen Mischungen aus ddPCR-Mastermix und cDNA-Proben wurden nun je 20 μl in die mittleren Wells der Cartridges übertragen. In die unteren Wells der Cartridges wurden jeweils 70 μl ddPCR-Öl gegeben. Nun wurde ein passendes Gasket über die Cartridges im Cartridgeholder gespannt und die Cartridge-Halterung in den QX200 Droplet Generator überführt. Im Anschluss wurden die fertigen „droplets“ auf eine 96-Well PCR-Platte übertragen. Daraufhin wurde die belegte

96-Well Platte mittels einer vorgesehenen Heat-Seal Folie durch den PX1™ PCR Plate Sealer versiegelt. Nun erfolgte die PCR-Reaktion im Thermozykler. Die verwendeten PCR-Programme (siehe Tabelle 3) für die jeweiligen Zielgene wurden an die Protokolle der qRT-PCR angelehnt, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen. Im Ansatz der ddPCR wurde auf die Schritte der finalen Denaturierung und der anschließenden Schmelzkurvenanalyse verzichtet.

Tabelle 3: Programm der Digitalen Droplet PCR

Schritt der ddPCR	Temperatur	Verweildauer	Zyklen-Anzahl
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	30 sec	45 Zyklen
Primer Annealing	Annealing-Temperatur des Primerpaars	20 sec	
Extension	72°C	Elongationszeit des Primerpaars	
Finale Extension	72°C	5 min	1 Zyklus
Pause	12°C	∞ (Infinite hold)	1 Zyklus

Verwendete Abkürzungen: Minuten (min), Sekunden (sec)

Im Anschluss wurde die 96-Well Platte in einer Haltevorrichtung innerhalb des QX200 Droplet Reader platziert und die Abdeckung geschlossen. Anschließend erfolgte eine Messung der Kopienanzahl/μl durch die Detektion eines Fluoreszenzsignals und die folgende automatische Verrechnung der als positiv (= mit enthaltenem Amplifikat) bzw. negativ (= ohne PCR-Produkt) identifizierten „droplets“ in einer Poisson-Verteilung. Die Ergebnisse der Messung wurden anschließend mittels der Software „QuantaSoft“ tabellarisch und grafisch für die einzelnen Proben dargestellt, gespeichert und dokumentiert.

3.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism, Version 6 durchgeführt. Die Darstellung der Daten erfolgte als arithmetisches Mittel (Mittelwert) inklusive Standardabweichung. Um signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Daten von qRT-PCR und ddPCR zu identifizieren, wurde für Ansatz 1 ein gepaarter parametrischer zweiseitiger t-Test und für Ansatz 2 eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Test nach Holm-Šídák durchgeführt, denen jeweils ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zu Grunde gelegt wurde.

Für die Bestimmung der Zellviabilität wurde ein biologisches Replikat von $N = 6$ und ein technisches Replikat von $n = 3$ angesetzt.

Bei der qRT-PCR wurde im Ansatz 1 ein biologisches Replikat von $N = 5$ und ein technisches Replikat von $n = 9$ zu Grunde gelegt. Ansatz 2 beinhaltet ein biologisches Replikat von $N = 6$ und ein technisches Replikat von $n = 3$.

In Bezug auf die Versuche der ddPCR wurde im Ansatz 1 ein biologisches Replikat von $N = 5$ und ein technisches Replikat von $n = 3$ gewählt. Ansatz 2 wurde mit einem biologischen Replikat von $N = 6$ und einem technischen Replikat von $n = 1$ angelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Zellviabilität

Ein wichtiger Faktor der endothelialen Dysfunktion im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion des menschlichen Körpers ist die vermehrte Leckage des vaskulären Endothels. Diese ist u.a. durch gesteigerte apoptotische und nekrotische Prozesse der Endothelzellen bedingt. Um eine eventuelle Verzerrung der qPCR- und ddPCR-Daten durch ein Stimulations- und/oder Supplementierungs-induziertes Zellsterben darstellen zu können, wurde ein Zellviabilitäts-Assay durchgeführt.

Bei dem verwendeten Viabilitäts-Assay handelt es sich um eine nicht-lytische Biolumineszenz-Methode. Die zelluläre Lebensfähigkeit wird anhand einer metabolischen Reaktion der vitalen Zellen und der Messung des hieraus resultierenden Lumineszenzsignals determiniert. Hierzu dienen die im Assay enthaltene NanoLuc® Luciferase und ein zellpermeables Prosubstrat, das MT Cell Viability Substrat. Vitale Zellen sind im Gegensatz zu toten Zellen in der Lage, dieses Prosubstrat in ein Substrat für die NanoLuc® Luciferase umzuwandeln. Die Stärke des ausgesendeten Lumineszenzsignals korreliert mit der Zahl der vitalen Zellen. Die Auswertung der Messdaten erfolgt grafisch über eine Analyse der Lumineszenzstärke pro Zeit.

In Abbildung 1 ist die ermittelte Zellviabilität humaner Endothelzellen der Zelllinie TIME in Abhängigkeit von einer Stimulation mit den Zytokinen TNF- α , IL-1 β und INF- γ in An- bzw. Abwesenheit von PUFA dargestellt. Die Zytokinstimulation der Endothelzellen erbrachte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Die Zahl der vitalen Zellen wurde durch die Stimulation mittels der verwendeten Zytokine um etwa die Hälfte verringert. Im Gegensatz hierzu hatte die PUFA-Supplementierung der Zellen keinen Einfluss auf die zelluläre Viabilität. Auch die Zytokin-induzierte Reduktion der zellulären Viabilität wurde durch die jeweilige PUFA-Supplementierung nicht beeinflusst.

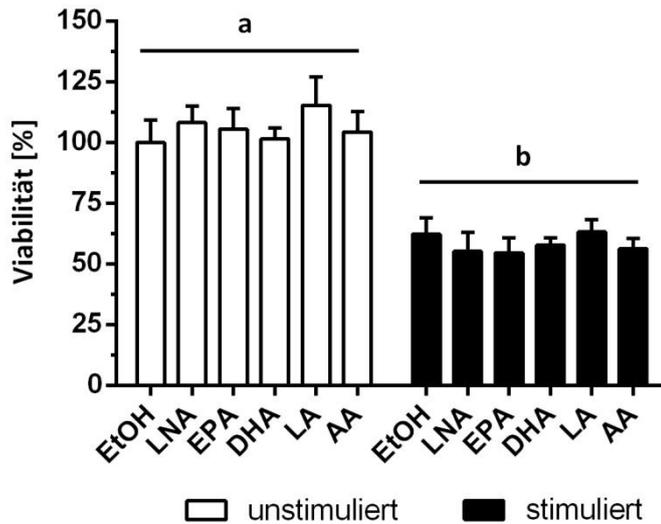


Abbildung 1: Viabilität der humanen Endothelzellen TIME in Abhängigkeit einer Zytokinstimulation und/oder PUFA-Supplementierung

Die Zellviabilität wurde mittels des RealTime-Glo MT Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Die humanen Endothelzellen wurden für 144 Stunden mit den ungesättigten Fettsäuren LNA, EPA, DHA, LA oder AA (15 μ M gelöst in 0,1 Vol.-% EtOH, Ethanol) bzw. ausschließlich in Gegenwart von 0,1 Vol.-% EtOH (Kontrolle) kultiviert. Zur Stimulation wurden die Zytokine TNF- α , IL-1 β und INF- γ in Konzentrationen von je 5 ng/ml in den letzten 24 Stunden der Fettsäuresupplementierung eingesetzt. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (N = 6, n = 3). Divergierende über den Balken abgebildete Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede.

4.2 Primeretablierung

Im Rahmen der Etablierung wurden die Primer mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse sowie einer Gelelektrophorese hinsichtlich Spezifität getestet. Die Schmelzkurve wurde im Temperaturbereich von 65°C bis 95°C in Temperaturschritten von je 0,5°C für jeweils 5 Sekunden durchgeführt. Hierbei zeigten sich bei keinem der im Rahmen der vorliegenden Dissertation etablierten Primer zusätzliche Peaks. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass jeweils nur ein einziges PCR-Produkt amplifiziert wurde. Die Spezifität der Primer wurde zudem durch die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Analyse bestätigt. Im Gel zeigten sich weder doppelte Banden noch Schlierenbildung. Der Vergleich der Größe der PCR-Produkte mit den Referenzbanden der DNA-Leiter erbrachte bei allen getesteten Primern eine Übereinstimmung mit den im Rahmen der Primerkonstruktion berechneten PCR-Produktgrößen. Des Weiteren wurden anhand der durchgeführten Gradienten-PCR die optimalen Annealing-Temperaturen für die verwendeten Primer dokumentiert und für die Amplifikationsvorgänge mittels qPCR und ddPCR angewendet.

4.3 Gegenüberstellung von qRT-PCR und ddPCR

In der vorliegenden Dissertation wurden zwei Methoden der PCR zur Quantifizierung genetischen Materials verwendet und in ihren Ergebnisse gegenübergestellt: die qRT-PCR als Verfahren der relativen Quantifizierung und die ddPCR als Vertreter der absoluten Quantifizierung. Hierbei wurden die Daten der qRT-PCR mittels der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Anhand der im Rahmen der ddPCR erhaltenen Messwerte wurde die Kopienzahl/ μ l ermittelt.

Der Vergleich der qRT-PCR und der ddPCR erfolgte anhand von zwei verschiedenen Stimulations- und Supplementierungsansätzen. Ansatz 1 beinhaltete eine Stimulation humaner Endothelzellen der Zelllinie TIME für 24 Stunden mit einem Zytokingemisch bestehend aus jeweils 100 ng/ml TNF- α , IL-1 β und INF- γ . Untersucht wurde die Auswirkung dieses pro-inflammatorischen Milieus auf die Expression von Genen, die an der Regulation der Gewebeperfusion beteiligt sind. Im Speziellen waren dies: Adra1b, Adra1d, Adrb2, ACE1, ATIP1, ATRAP, EdnrA und EdnrB. Als Referenzgen zur Normierung der relativen Quantifizierung wurde 18S rRNA genutzt. Ansatz 2 beinhaltete eine Supplementierung der TIME für 144 Stunden mit den ungesättigten Fettsäuren LNA, EPA, DHA, LA oder AA in einer Konzentration von 15 μ M in Kombination mit einer Zytokinstimulation (jeweils 5 ng/ml TNF- α , IL-1 β und INF- γ) in den letzten 24 Stunden der Fettsäuresupplementierung. Untersucht wurden die Folgen der kombinierten Supplementierung und Stimulation für die Expression von Genen, die mit einer endothelialen Schädigung assoziiert werden, unterteilt in 5 Subgruppen: Adhäsionsproteine, Koagulationsfaktoren, pro-inflammatorische Botenstoffe, Proliferations- und Differenzierungsfaktoren sowie Chemokine. In der Gruppe der Adhäsionsproteine wurden ICAM-1 und VCAM-1 untersucht. Als Vertreter der Koagulationsfaktoren wurden PAI-1, vWF und TF betrachtet. Im Fokus der pro-inflammatorischen Botenstoffe standen IL-1 β , IL-6 sowie TNF- α . Als Repräsentant der Proliferations- und Differenzierungsfaktoren wurde GM-CSF untersucht. Zuletzt betrachtet wurden die Chemokine IL-8 und MCP-1. Als Referenzgen zur Normierung der qRT-PCR diente ACTB. Um einen Vergleich zwischen qRT-PCR und ddPCR ziehen zu können, wurden für beide Ansätze die jeweils mit den Verfahren erzielten Messdaten grafisch gegenübergestellt. Hierbei wurde die Übereinstimmung der Ergebnisse von qRT-PCR- und ddPCR-Daten in Hinblick auf das Auftreten eines Effektes, die aufgezeigte Effektrichtung sowie das indizierte Ausmaß der Effektstärke bestimmt. Abschließend wurde geprüft, ob eine Tendenz zur Effektüber- bzw. unterschätzung durch eines der Verfahren vorliegt.

4.3.1 Ansatz 1

Im Ansatz 1 wurden die Zielgene, welche die Gewebepерfusion beeinflussen, im Rahmen der qRT-PCR und ddPCR untersucht. Die Untersuchung fand in folgender Reihenfolge statt: (1) Adrenorezeptoren, (2) Angiotensin-assoziierte Proteine und (3) Endothelin-Rezeptoren.

4.3.1.1 Adrenorezeptoren

Innerhalb von Ansatz 1 wurden drei verschiedene Adrenorezeptoren betrachtet und die Ergebnisse aus qRT-PCR und ddPCR verglichen. Zwei der untersuchten Zielgene gehörten hierbei zur Familie der α_1 -Adrenorezeptoren, während eines der untersuchten Gene zur Familie der β -Adrenorezeptoren zählte. Die α -Adrenorezeptoren wurden von Adra1b und Adra1d, die β_2 -Familie von Adrb2 repräsentiert.

In Hinblick auf Adra1b ergab sowohl die qRT-PCR, als auch die ddPCR eine signifikante Reduktion der Genexpression in Folge der Zytokinstimulation. Die Ergebnisse der qRT-PCR belegten eine Reduktion der nachweisbaren Adra1b-mRNA auf das 0,6-fache bezogen auf unstimulierte Zellen (Abb. 2). Bei der ddPCR war eine Reduktion auf das 0,8-fache der Ausgangsexpression zu verzeichnen (Abb. 2).

Auch die Analyse von Adra1d zeigte bei beiden Untersuchungsmethoden Zytokin-induziert eine signifikante Reduktion der Genexpression. Die mittels qRT-PCR nachweisbare mRNA-Menge von Adra1d belief sich auf das 0,1-fache des Wertes der unstimulierten Kontrolle (Abb. 2). Die absolute Quantifizierung erbrachte eine Reduktion der Genexpression von Adra1d auf das 0,5-fache des Wertes unstimulierter Endothelzellen (Abb. 2).

Im Falle von Adrb2 ergaben die getesteten Analysemethoden widersprüchliche Daten. Im Rahmen der qRT-PCR zeigte sich eine signifikante Verminderung der Genexpression auf das 0,7-fache bezogen auf unstimulierte TIME (Abb. 2). Die Ergebnisse der ddPCR erbrachten hingegen eine nicht-signifikante Erhöhung der Expression von Adrb2 auf das 1,2-fache des unstimulierten Zustands (Abb. 2).

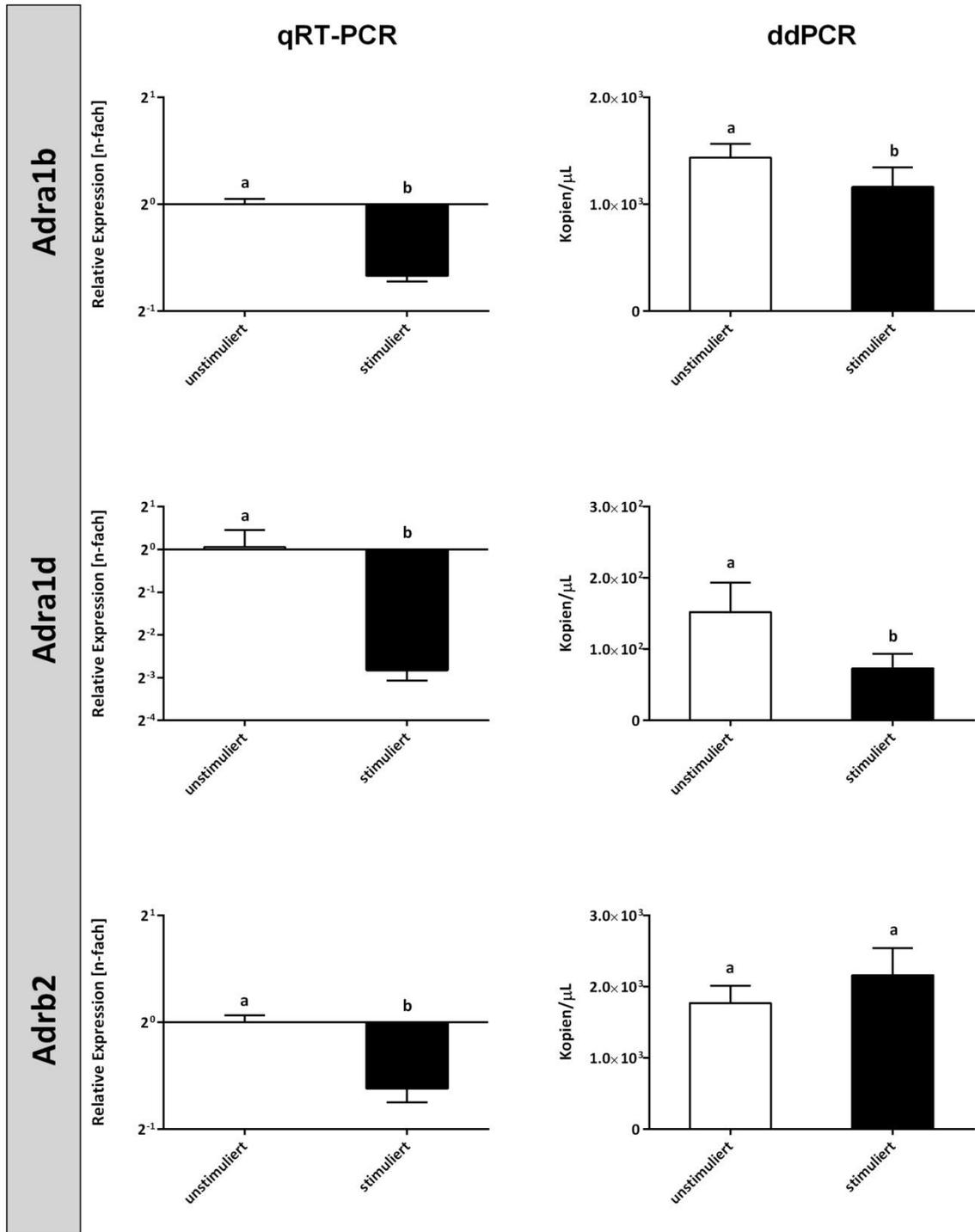


Abbildung 2: Gegenüberstellung der qRT-PCR- und ddPCR-Daten bezüglich der Zytokin-induzierten Genexpressionsänderungen von Adra1b, Adra1d und Adrb2

Die Stimulation der humanen Endothelzellen (Zelllinie TIME) erfolgte für 24 Stunden mit TNF- α , IL-1 β und INF- γ in Konzentrationen von je 100 ng/ml. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (qRT-PCR: N = 5, n = 9; ddPCR: N = 5, n = 3). Divergierende über den Balken abgebildete Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede.

4.3.1.2 Angiotensin-assoziierte Proteine

Die vergleichende Untersuchung der Angiotensin-assoziierten Proteine umfasste ACE1, ATIP1 und ATRAP. ACE1 und ATIP1 erhöhen bei vermehrter Expression und Ausschüttung den Blutdruck über eine Aktivierung des RAAS, wohingegen ATRAP eine hemmende Wirkung auf diese Hormonkaskade ausübt und somit bei vermehrtem Vorkommen eine Senkung des Blutdrucks nach sich zieht.

Sowohl die Daten von qRT-PCR als auch der ddPCR ergaben eine signifikante Reduktion der ACE1-Expression in Folge der Zytokinstimulation. Laut qRT-PCR verminderte sich die nachweisbare Menge an ACE1-mRNA auf das 0,1-fache im Vergleich zu unstimulierten Endothelzellen (Abb. 3). Die ddPCR zeigte eine Verminderung auf das 0,03-fache der Ausgangsexpression an (Abb. 3).

In Bezug auf die Genexpression von ATIP1 indizierten die erhobenen Werte beider Analyseverfahren eine Zytokin-vermittelte signifikante Reduktion. Die Zytokinstimulation der Endothelzellen ging mit einer Verminderung der mRNA-Synthese auf das 0,5-fache (qRT-PCR) bzw. 0,4-fache (ddPCR) unstimulierter TIME zurück (Abb. 3).

In Hinblick auf ATRAP wurde sowohl mittels qRT-PCR, als auch mittels ddPCR eine signifikante Erhöhung der Genexpression festgestellt. Die qRT-PCR verzeichnete eine Erhöhung auf das 2,3-fache und die ddPCR eine Erhöhung auf das 1,8-fache der Ausgangsexpression (Abb. 3).

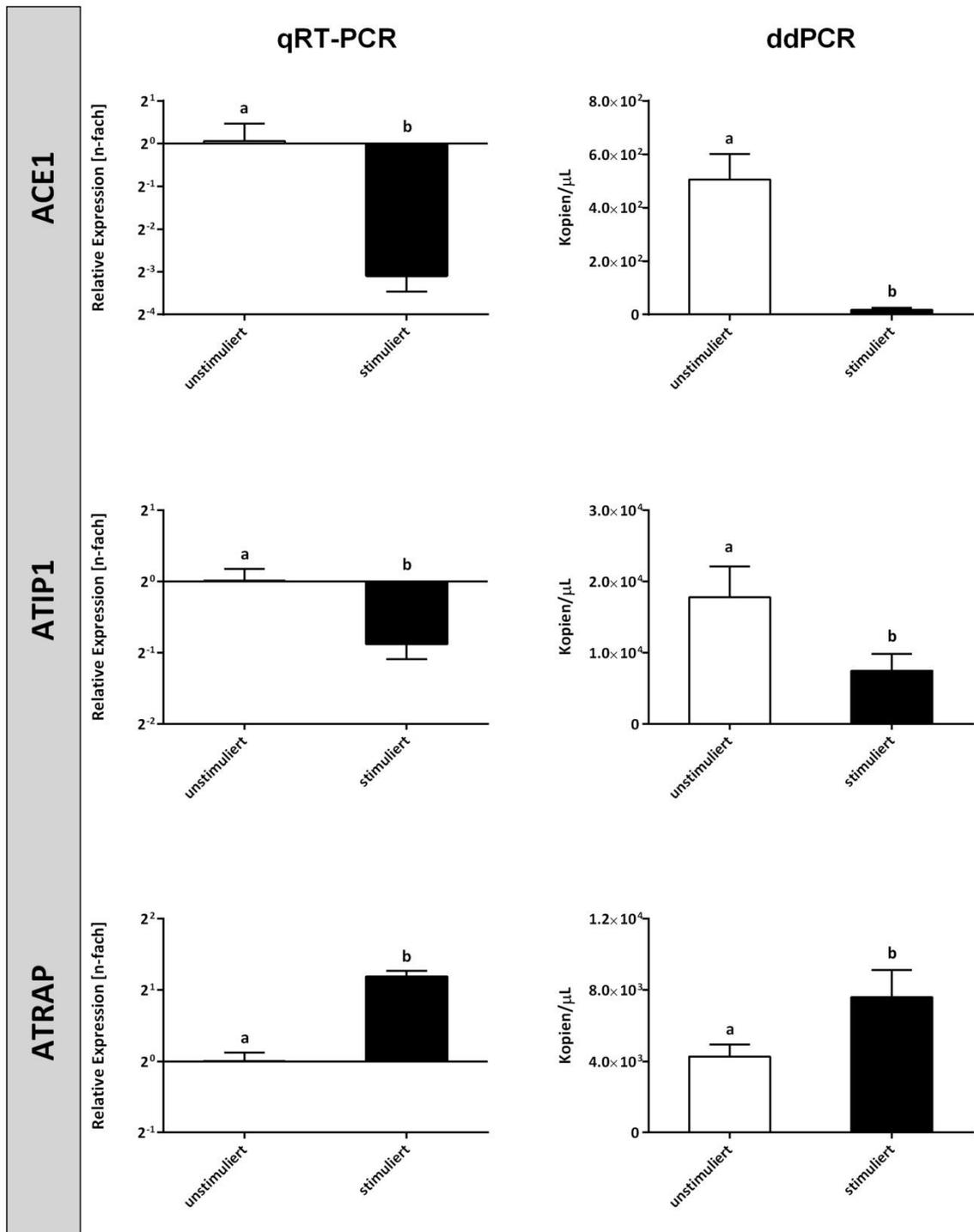


Abbildung 3: Gegenüberstellung der qRT-PCR- und ddPCR-Daten bezüglich der Zytokin-induzierten Genexpressionsänderungen von ACE1, ATIP1 und ATRAP

Die Stimulation der humanen Endothelzellen (Zelllinie TIME) erfolgte für 24 Stunden mit TNF- α , IL-1 β und INF- γ in Konzentrationen von je 100 ng/ml. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (qRT-PCR: N = 5, n = 9; ddPCR: N = 5, n = 3). Divergierende über den Balken abgebildete Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede.

4.3.1.3 Endothelin-Rezeptoren

Neben den Adrenorezeptoren und den Angiotensin-assoziierten Proteinen wurden zwei Endothelin-Rezeptoren, EdnrA und EdnrB, betrachtet und die Untersuchungsergebnisse der qRT-PCR und ddPCR einander gegenübergestellt. Beide Rezeptoren vermitteln beim Menschen eine blutdrucksteigernde Wirkung.

Die Expression des EdnrA war in Folge der Zytokinstimulation der Endothelzellen vermindert, wobei dieser Effekt ausschließlich mittels der qRT-PCR als signifikant charakterisiert wurde. Die mRNA-Expression des EdnrA zeigte entsprechend der Daten der qRT-PCR eine Reduktion auf das 0,2-fache des Wertes der unstimulierten Endothelzellen (Abb. 4). Bei der ddPCR wurde eine Reduktion der Genexpression von EdnrA auf das 0,4-fache festgestellt (Abb. 4).

Bei EdnrB zeigten die ermittelten Daten der qRT-PCR und der ddPCR übereinstimmend eine signifikante Reduktion der Genexpression an. Entsprechend qRT-PCR war die Expression von EdnrB nach Zytokin-Behandlung der Endothelzellen auf das 0,09-fache unstimulierter Kontrollzellen vermindert (Abb. 4). Im Rahmen der ddPCR ergab sich eine Reduktion auf das 0,3-fache der Ausgangsexpression (Abb. 4).

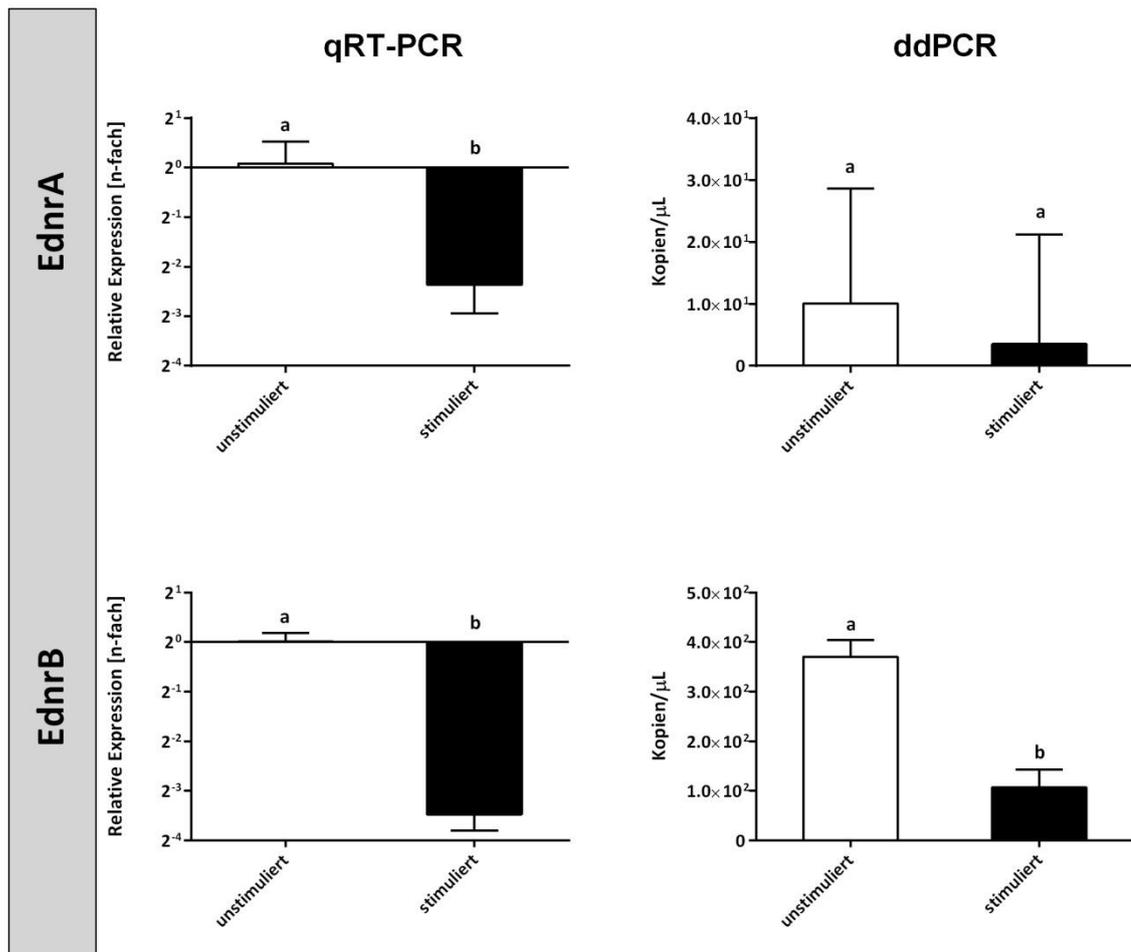


Abbildung 4: Gegenüberstellung der qRT-PCR- und ddPCR-Daten bezüglich der Zytokin-induzierten Genexpressionsänderungen von EdnrA und EdnrB

Die Stimulation der humanen Endothelzellen (Zelllinie TIME) erfolgte für 24 Stunden mit TNF- α , IL-1 β und INF- γ in Konzentrationen von je 100 ng/ml. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (qRT-PCR: N = 5, n = 9; ddPCR: N = 5, n = 3). Divergierende über den Balken abgebildete Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede.

4.3.2 Ansatz 2

Im Ansatz 2 wurden Zielgene untersucht, welche sich mit folgenden Themenbereichen im Rahmen einer pro-inflammatorischen Reaktion endothelialer Zellen beschäftigen: (1) Adhäsionsproteine, (2) Koagulationsfaktoren, (3) pro-inflammatorische Botenstoffe, (4) Proliferations- und Differenzierungsfaktoren und (5) Chemokine.

4.3.2.1 Adhäsionsproteine

Die Expression von ICAM-1 war in Folge einer Zytokinstimulation signifikant erhöht. Die relative Quantifizierung mittels qRT-PCR erbrachte eine Steigerung der Expression auf das 154,2-fache (Abb. 5). Mittels absoluter Quantifizierung (ddPCR) wurde eine Steigerung der ICAM-1-Expression auf das 88,3-fache des Ausgangswertes gemessen (Abb. 5). Die Auswirkungen einer Fettsäuresupplementierung auf die zelluläre Expression von ICAM-1

stellten sich deutlich geringer dar. Bei unstimulierten TIME wurden in Folge einer PUFA-Anreicherung der Zellen mittels qRT-PCR keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollprobe ohne Fettsäuresupplement (EtOH) festgestellt. Die absolute Quantifizierung mittels ddPCR indizierte hingegen eine signifikante Steigerung der ICAM-1-Expression bei Supplementierung mit LNA auf das 1,9-fache und mit LA auf das 2,4-fache im Vergleich zu un-supplementierten Zellen (Abb. 5). In Folge der kombinierten Behandlung der TIME mit Zytokinen und Fettsäuren resultierten bei beiden Quantifizierungsverfahren signifikante Unterschiede bei den Fettsäuren LNA, DHA und LA. Gemessen mit der qRT-PCR zeigten sich in Bezug auf die stimulierte und un-supplementierte Kontrolle signifikante Erhöhungen der Genexpression von ICAM-1 bei Supplementierung von LNA (auf das 1,4-fache) und LA (auf das 1,4-fache) (Abb. 5). Die DHA-Supplementierung der Zellen ging hingegen mit einer signifikanten Reduktion des Stimulationseffektes auf das 0,7-fache einher (Abb. 5). In Übereinstimmung zu den qRT-PCR-Daten erbrachte auch die ddPCR-basierte Analyse eine signifikante Steigerung des Zytokineffektes bei Supplementierung der Zellen mit den Fettsäuren LNA (auf das 1,4-fache) und LA (auf das 1,3-fache) (Abb. 5). Ebenfalls analog zur qRT-PCR zeigte sich im Vergleich zur Zytokin-stimulierten und un-supplementierten Kontrolle eine signifikante Reduktion der Expression von ICAM-1 unter DHA-Supplementierung auf das 0,3-fache (Abb. 5). Zudem stellte sich bei der ddPCR im Gegensatz zu den Daten der qRT-PCR eine Reduktion der ICAM-1-Expression auf das 0,3-fache in Folge einer AA-Supplementierung stimulierter TIME dar (Abb. 5).

Auch bei VCAM-1 war durch die Stimulation mittels des Zytokingemisches bei beiden Quantifizierungsmethoden eine signifikante Erhöhung der Genexpression zu beobachten. Im Hinblick auf den alleinigen Stimulationseffekt ohne PUFA-Supplementierung zeigte sich eine Erhöhung der genetischen Expression bei der relativen Quantifizierung auf das 7,0-fache, während bei der absoluten Quantifizierung sogar eine Erhöhung auf das 68,4-fache des Ausgangswertes ohne Zytokinstimulation zu verzeichnen war (Abb. 5). Bei Betrachtung der unstimulierten, PUFA-supplementierten TIME wurde mittels qRT-PCR bei allen untersuchten Fettsäuren eine signifikante Reduktion der Genexpression gemessen. Die Expressionsrate sank bei Anreicherung der Zellen mit LA auf das 0,9-fache, mit LNA auf das 0,4-fache und mit DHA auf das 0,2-fache (Abb. 5). Die stärkste Reduktion der Genexpression in Bezug auf die un-supplementierte Kontrolle stellte sich bei AA-Supplementierung (auf das 0,1-fache) und EPA-Supplementierung (auf das 0,1-fache) dar (Abb. 5). Die ddPCR ergab hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen supplementierten und un-supplementierten Zellen (Abb. 5). Im Hinblick auf die Zytokinstimulation bei gleichzeitiger PUFA-Supplementierung resultierte übereinstimmend bei qRT-PCR und ddPCR eine signifikante Reduktion des Stimulationseffektes

durch Anreicherung der Zellen mit den Fettsäuren EPA, DHA und AA. In Bezug auf stimulierte aber un-supplementierte TIME war die Expression von VCAM-1 laut qRT-PCR bei Supplementierung mit EPA auf das 0,4-fache, mit DHA auf das 0,3-fache und mit AA auf das 0,4-fache vermindert. Die ddPCR erbrachte eine Reduktion der Genexpression durch EPA auf das 0,2-fache, durch DHA auf das 0,09-fache und durch AA auf das 0,06-fache (Abb. 5). Weiterhin wurde mittels ddPCR eine signifikante Verminderung der VCAM-1-Expression auf das 0,7-fache in Folge einer LNA-Supplementierung stimulierter TIME beobachtet (Abb. 5).

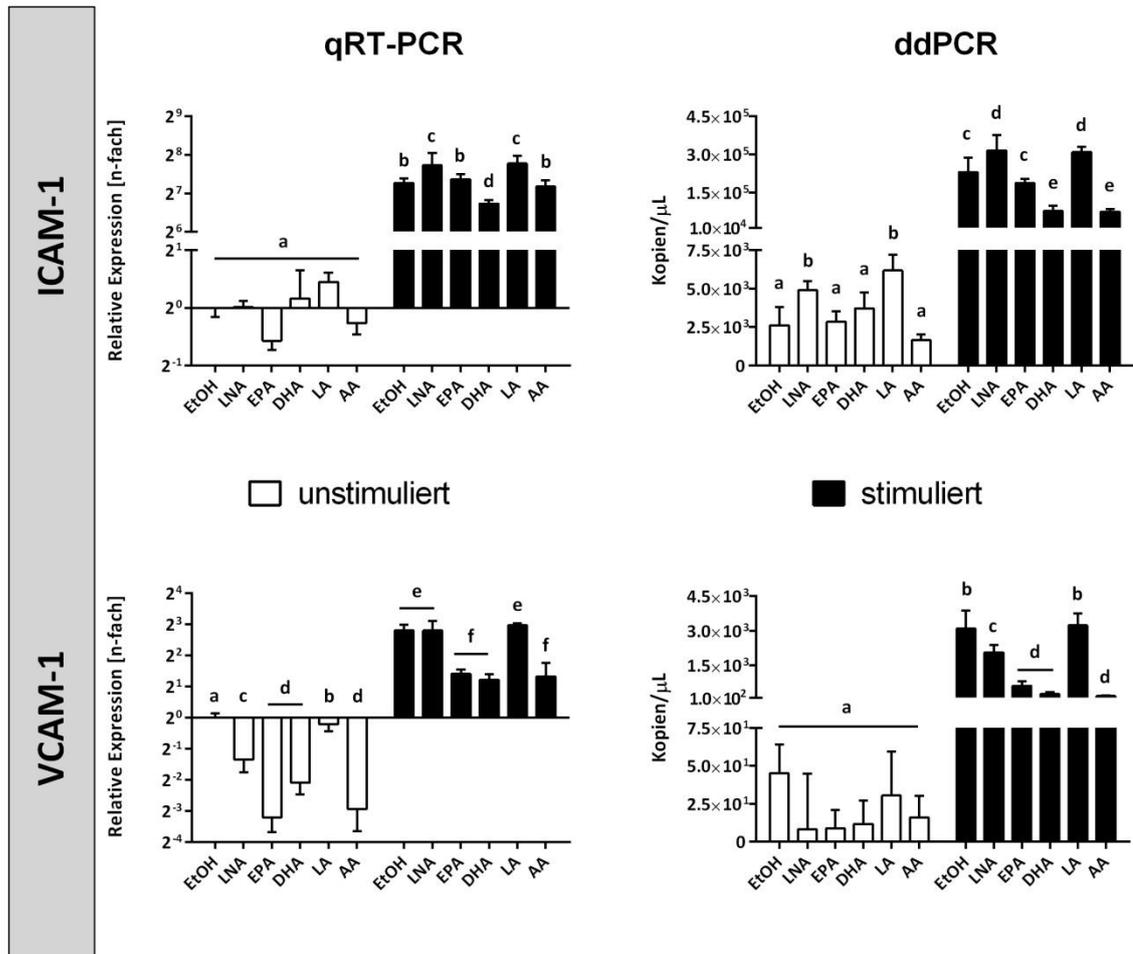


Abbildung 5: Gegenüberstellung der qRT-PCR- und ddPCR-Daten bezüglich der Fettsäuren- und Zytokin-induzierten Genexpressionsänderungen von ICAM-1 und VCAM-1

Die humanen Endothelzellen wurden für 144 Stunden mit den ungesättigten Fettsäuren LNA, EPA, DHA, LA oder AA (15 µM gelöst in 0,1 Vol.-% EtOH) bzw. ausschließlich in Gegenwart von 0,1 Vol.-% EtOH (Kontrolle) kultiviert. Zur Stimulation wurden die Zytokine TNF- α , IL-1 β und INF- γ in Konzentrationen von je 5 ng/ml in den letzten 24 Stunden der Fettsäuresupplementierung eingesetzt. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (qRT-PCR: N = 6, n = 3; ddPCR: N = 6, n = 1). Divergierende über den Balken abgebildete Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede.

4.3.2.2 Koagulationsfaktoren

Bei PAI-1 zeigte sich im Hinblick auf die Zytokinstimulation sowohl bei der qRT-PCR als auch bei der ddPCR eine signifikante Steigerung der Genexpression. Die Erhöhung der PAI-1-Expression wurde mittels qRT-PCR auf das 3,7-fache und mittels ddPCR auf das 3,6-fache des Wertes ohne Stimulation quantifiziert (Abb. 6). Eine PUFA-Supplementierung unstimulierter Zellen zeigte bei beiden Methoden keine signifikanten Auswirkungen auf die PAI-1-Expression bei Einsatz der Fettsäuren LNA, DHA und LA (Abb. 6). Die Anreicherung der TIME mit EPA bewirkte hingegen eine signifikante Reduktion der Expression verglichen mit der unstimulierten EtOH-Kontrolle (qRT-PCR: auf das 0,8-fache, ddPCR: auf das 0,5-fache) (Abb. 6). Zudem ergab die ddPCR eine signifikante Reduktion der PAI-1-Expression bei AA-Supplementierung auf das 0,1-fache des Wertes der unsupplementierten und unstimulierten Kontrolle. Die qRT-PCR Analyse von Zellen, die der kombinierten Behandlung mit Zytokinen und Fettsäuren unterzogen wurden, erbrachte in Bezug auf die stimulierte Kontrolle eine signifikante Reduktion der Genexpression von PAI-1 bei Supplementierung von DHA (auf das 0,9-fache) und AA (auf das 0,8-fache) (Abb. 6). Mittels ddPCR wurde für alle untersuchten PUFA ein signifikant hemmender Einfluss auf den Stimulationseffekt beobachtet. Die PAI-1-Expression wurde durch LNA auf das 0,5-fache, durch EPA auf das 0,4-fache, durch DHA auf das 0,2-fache, durch LA auf das 0,7-fache und durch AA auf das 0,1-fache des Wertes der unsupplementierten aber Zytokin-stimulierten Kontrolle gesenkt (Abb. 6).

Bei vWF war durch die Zytokinstimulation bei beiden Quantifizierungsmethoden eine signifikante Reduktion der Genexpression zu beobachten. Im Hinblick auf den alleinigen Stimulationseffekt ohne PUFA-Supplementierung zeigte sich eine Reduktion der vWF-Expression auf das 0,8-fache (qRT-PCR) bzw. auf das 0,1-fache (ddPCR) der unstimulierten Kontrolle (Abb. 6). Bei Betrachtung der unstimulierten, PUFA-supplementierten TIME wurde durch die qRT-PCR bei vier der fünf untersuchten PUFA eine signifikante Reduktion der Genexpression gemessen. Die Expressionsrate sank bei Supplementierung der TIME mit LNA auf das 0,8-fache, mit EPA auf das 0,7-fache, mit DHA auf das 0,5-fache und mit AA auf das 0,6-fache (Abb. 6). Die ddPCR ergab bei allen PUFA signifikante Unterschiede zwischen supplementierten und unsupplementierten Zellen (Abb. 6). Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der vWF-Expression bei Supplementierung von LNA auf das 0,4-fache, von EPA auf das 0,5-fache, von DHA auf das 0,3-fache, von LA auf das 0,4-fache und von AA auf das 0,2-fache (Abb. 6). Bei Betrachtung der Zytokinbehandlung unter gleichzeitiger PUFA-Supplementierung resultierte bei qRT-PCR und ddPCR eine verstärkte Reduktion der vWF-Expression unabhängig von der Art der untersuchten Fettsäure. In Bezug auf stimulierte aber

unsupplementierte TIME war die vWF-Expression laut qRT-PCR bei Supplementierung von LNA auf das 0,4-fache, von EPA auf das 0,4-fache, von DHA auf das 0,4-fache, von LA auf das 0,6-fache und von AA auf das 0,4-fache reduziert. Die ddPCR erbrachte eine Reduktion der Genexpression durch LNA auf das 0,3-fache, durch EPA auf das 0,3-fache, durch DHA auf das 0,1-fache und durch LA auf das 0,7-fache (Abb. 6). Die deutlichste Reduktion der Genexpression in Bezug auf die stimulierte EtOH-Probe stellte sich bei AA-Supplementierung auf das 0,02-fache dar (Abb. 6).

Die Expression von TF zeigte sich in Folge einer Zytokinstimulation signifikant erhöht. Die qRT-PCR erbrachte eine Steigerung der Expression auf das 2,4-fache des Kontrollwertes (Abb. 6). Mittels ddPCR wurde eine Steigerung der Expression von TF auf das 11,2-fache gemessen (Abb. 6). Bei Untersuchung des PUFA-Effekts bei unstimulierten TIME wurden mittels qRT-PCR signifikante Unterschiede bei allen untersuchten Fettsäuren im Vergleich zu EtOH festgestellt. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Genexpression bei Supplementierung von LNA auf das 2,2-fache, von EPA auf das 1,9-fache, von DHA auf das 2,7-fache, von LA auf das 2,0-fache und von AA auf das 2,2-fache (Abb. 6). Die ddPCR indizierte eine signifikante Steigerung der Genexpression von TF lediglich bei DHA-Supplementierung (1,7-fach im Vergleich zu EtOH) (Abb. 6). Zudem zeigte sich eine Reduktion der Genexpression unter Supplementierung von AA auf das 0,4-fache des Wertes der unstimulierten Kontrolle. In Folge der kombinierten Behandlung der TIME mit Zytokinen und PUFA wiesen beide Verfahren auf signifikante Unterschiede bei unterschiedlichen Fettsäuresupplementen hin. Bei der qRT-PCR zeigten sich in Bezug auf die stimulierte EtOH-Probe signifikante Erhöhungen der Genexpression von TF bei Supplementierung von LNA (auf das 1,9-fache), von LA (auf das 1,5-fache) und von AA (auf das 1,4-fache) (Abb. 6). Die Supplementierung der TIME mit EPA ging hingegen mit einer signifikanten Reduktion des Stimulationseffektes auf das 0,7-fache einher (Abb. 6). Bei DHA hingegen zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion des Effektes durch die Zytokinstimulation auf das 0,8-fache (Abb. 6). In Übereinstimmung mit den Daten der qRT-PCR indizierte auch die ddPCR-basierte Analyse eine signifikante Steigerung des Zytokineffektes bei Supplementierung der Zellen mit den Fettsäuren LNA (auf das 1,4-fache) und LA (auf das 1,5-fache) (Abb. 6). Ebenfalls analog zur qRT-PCR zeigte sich bei der ddPCR eine signifikante Reduktion der Expression von TF unter EPA-Supplementierung (auf das 0,5-fache) (Abb. 6). Reduktionen der Genexpression in Bezug auf die unsupplementierte Kontrolle stellten sich ebenso bei DHA-Supplementierung auf das 0,4-fache und unter AA-Supplementierung auf das 0,5-fache dar (Abb. 6).

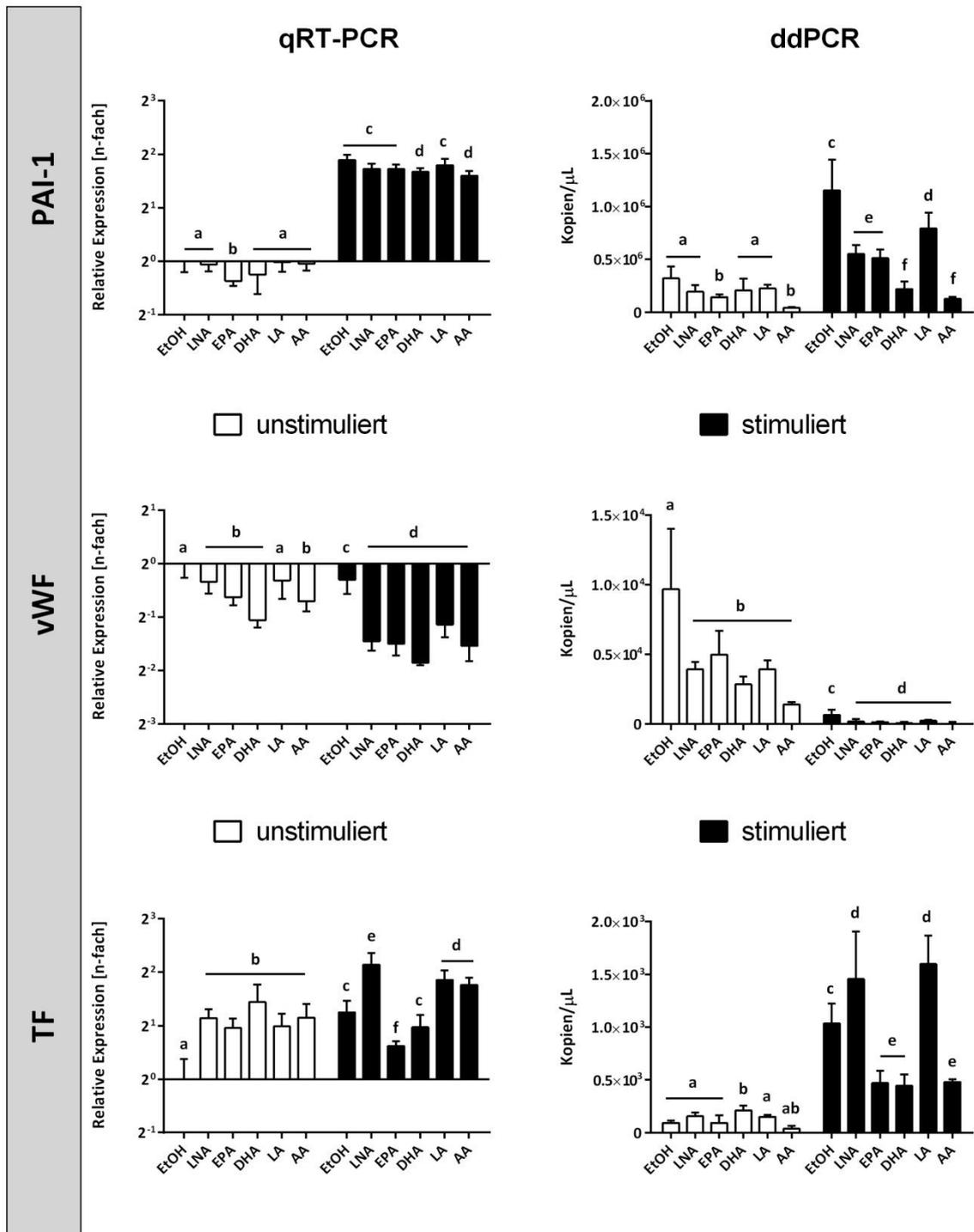


Abbildung 6: Gegenüberstellung der qRT-PCR- und ddPCR-Daten bezüglich der Fettsäuren- und Zytokin-induzierten Genexpressionsänderungen von PAI-1, vWF und TF

Die humanen Endothelzellen wurden für 144 Stunden mit den ungesättigten Fettsäuren LNA, EPA, DHA, LA oder AA (15 µM gelöst in 0,1 Vol.-% EtOH) bzw. ausschließlich in Gegenwart von 0,1 Vol.-% EtOH (Kontrolle) kultiviert. Zur Stimulation wurden die Zytokine TNF- α , IL-1 β und INF- γ in Konzentrationen von je 5 ng/ml in den letzten 24 Stunden der Fettsäuresupplementierung eingesetzt. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (qRT-PCR: N = 6, n = 3; ddPCR: N = 6, n = 1). Divergierende über den Balken abgebildete Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede.

4.3.2.3 Pro-inflammatorische Botenstoffe

Bei Betrachtung von IL-1 β zeigte sich in Folge einer Zytokinstimulation der Zellen bei beiden genutzten Analyseverfahren eine signifikante Steigerung der Genexpression. Die Erhöhung der Expression von IL-1 β wurde mittels qRT-PCR auf das 5,5-fache und mittels ddPCR auf das 61,3-fache des Ausgangswertes ohne Zytokinstimulation quantifiziert (Abb. 7). Eine PUFA-Supplementierung unstimulierter Zellen hatte laut beider Quantifizierungsmethoden keine signifikanten Auswirkungen auf die IL-1 β -Expression (Abb. 7). Die qRT-PCR-Analyse von TIME, die der kombinierten Behandlung mit Zytokinen und Fettsäuren unterzogen wurden, erbrachte in Bezug auf die stimulierte und un-supplementierte Kontrolle eine signifikante Reduktion der Genexpression von IL-1 β bei Supplementierung von LNA (auf das 0,7-fache), DHA (auf das 0,8-fache) und AA (auf das 0,6-fache) (Abb. 7). Mittels ddPCR wurde für alle untersuchten PUFA ein signifikant hemmender Einfluss auf den Stimulationseffekt beobachtet. Die Genexpression wurde durch LNA auf das 0,4-fache, durch EPA auf das 0,6-fache und durch LA auf das 0,7-fache des Wertes der Zytokin-behandelten, un-supplementierten Kontrolle gesenkt (Abb. 7). Die stärkste Reduktion der Genexpression von IL-1 β stellte sich bei Supplementierung von DHA bzw. AA (jeweils auf das 0,2-fache) dar (Abb. 7).

Im Hinblick auf IL-6 war durch die Zytokinstimulation bei beiden Quantifizierungsmethoden eine signifikante Steigerung der Genexpression zu beobachten. Die relative Quantifizierung ergab eine Erhöhung der messbaren Menge an IL-6-mRNA auf das 9,6-fache, die absolute Quantifizierung sogar eine Steigerung auf das 12,0-fache des Wertes unstimulierter Zellen (Abb. 7). Bei Betrachtung der unstimulierten, PUFA-supplementierten TIME zeigten sich bei der qRT-PCR keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur unstimulierten und un-supplementierten Kontrolle (Abb. 7). Die ddPCR hingegen ergab bei den PUFA DHA und AA signifikante Effekte. Hier stellte sich eine Reduktion der IL-6-Expression bei Supplementierung von DHA auf das 0,7-fache und von AA auf das 0,6-fache dar (Abb. 7). Bei Betrachtung der Zytokinstimulation unter gleichzeitiger PUFA-Supplementierung wurde im Rahmen der qRT-PCR-Analyse bei Supplementierung von EPA bzw. AA eine signifikante Steigerung der IL-6-Expression auf das 1,9-fache (EPA) bzw. auf das 2,1-fache (AA) beobachtet (Abb. 7). Unter Supplementierung mit DHA zeigte sich hingegen eine signifikante Reduktion der Genexpression von IL-6 auf das 0,6-fache des Wertes der stimulierten und un-supplementierten Kontrolle (Abb. 7). Im Gegensatz zu den Daten der qRT-PCR erbrachte die ddPCR ausschließlich PUFA-bedingte signifikante Verminderungen des Stimulationseffektes (durch LNA auf das 0,5-fache, durch DHA auf das 0,3-fache und durch LA auf das 0,7-fache) (Abb. 7).

Auch bei TNF- α war durch die Stimulation mittels des Zytokingemisches bei beiden Quantifizierungsmethoden eine signifikante Erhöhung der Genexpression zu beobachten. Im Hinblick auf den alleinigen Stimulationseffekt ohne PUFA-Supplementierung zeigte sich eine Erhöhung der genetischen Expression bei der relativen Quantifizierung auf das 2,1-fache, während bei der ddPCR sogar eine Erhöhung auf das 129,9-fache des Wertes unstimulierter Zellen zu verzeichnen war (Abb. 7). Bei Betrachtung der unstimulierten, PUFA-supplementierten TIME wurde mittels qRT-PCR bei 3 der 5 untersuchten Fettsäuren eine signifikante Reduktion der Genexpression gemessen. Die Expressionsrate sank bei Anreicherung der Zellen mit EPA auf das 0,5-fache, mit DHA auf das 0,4-fache und mit AA auf das 0,5-fache (Abb. 7). Die ddPCR ergab hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen supplementierten und un-supplementierten Zellen (Abb. 7). Im Hinblick auf die Zytokinstimulation bei gleichzeitiger PUFA-Supplementierung resultierte bei qRT-PCR und ddPCR eine signifikante Reduktion des Stimulationseffektes durch PUFA-Anreicherung der Zellen bei allen untersuchten Fettsäuren. In Bezug auf stimulierte und un-supplementierte TIME war die Expression von TNF- α gemessen mittels qRT-PCR unter Supplementierung mit LNA auf das 0,7-fache, mit EPA auf das 0,5-fache, mit LA auf das 0,4-fache und mit AA auf das 0,5-fache vermindert. Die stärkste Reduktion der Genexpression von TNF- α in Bezug auf die Kontrolle stellte sich bei DHA-Supplementierung (auf das 0,08-fache) dar (Abb. 7). Die ddPCR erbrachte eine PUFA-vermittelte Reduktion des Stimulationseffektes durch LNA auf das 0,4-fache, durch EPA auf das 0,3-fache, durch LA auf das 0,4-fache und durch AA auf das 0,3-fache (Abb. 7). Weiterhin wurde mittels ddPCR übereinstimmend mit den Daten der qRT-PCR-Analyse in Folge einer DHA-Supplementierung stimulierter TIME eine signifikante Verminderung der Zytokin-induzierten TNF- α -Expression auf das 0,1-fache beobachtet (Abb. 7).

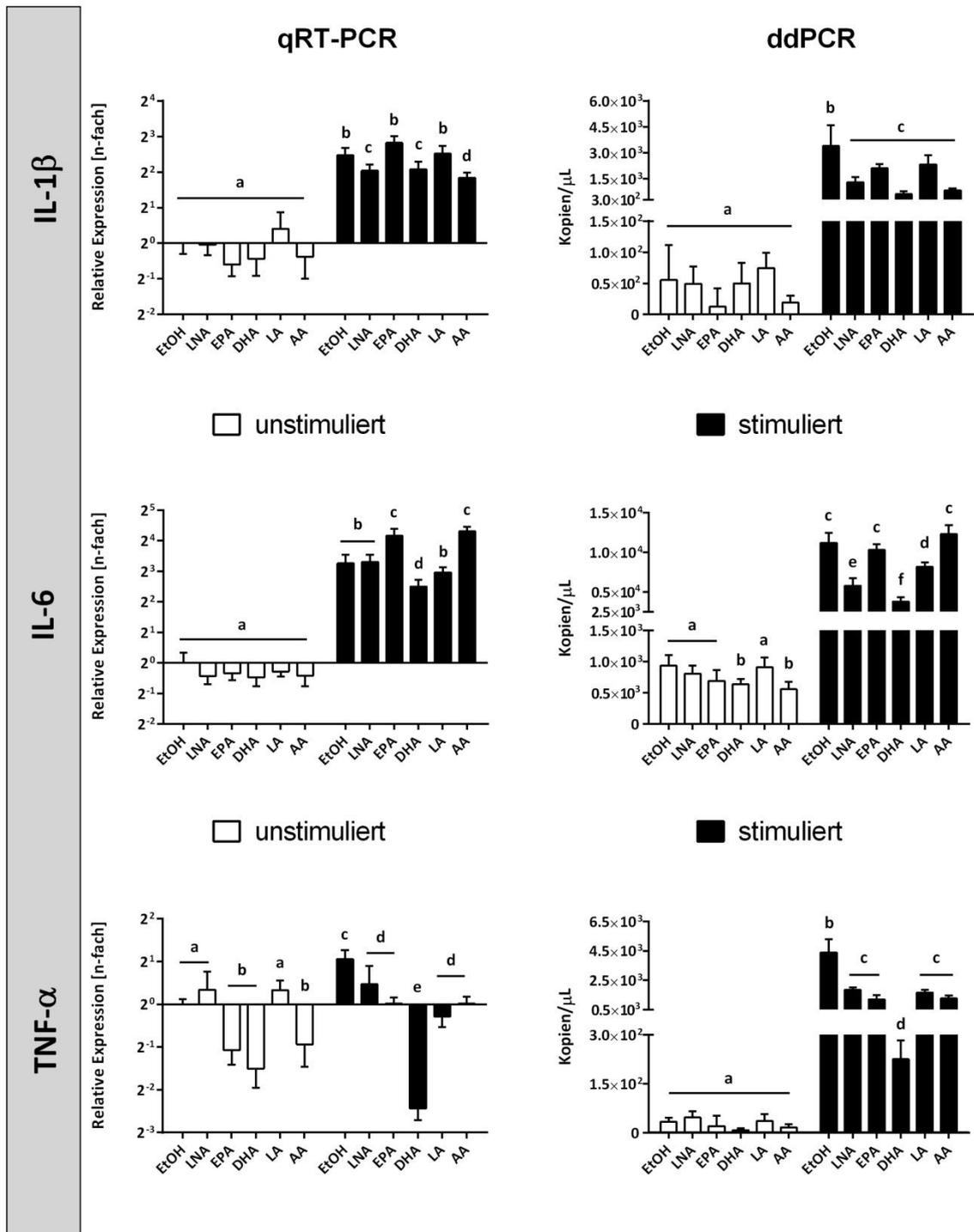


Abbildung 7: Gegenüberstellung der qRT-PCR- und ddPCR-Daten bezüglich der Fettsäuren- und Zytokin-induzierten Genexpressionsänderungen von IL-1 β , IL-6 und TNF- α

Die humanen Endothelzellen wurden für 144 Stunden mit den ungesättigten Fettsäuren LNA, EPA, DHA, LA oder AA (15 μ M gelöst in 0,1 Vol.-% EtOH) bzw. ausschließlich in Gegenwart von 0,1 Vol.-% EtOH (Kontrolle) kultiviert. Zur Stimulation wurden die Zytokine TNF- α , IL-1 β und INF- γ in Konzentrationen von je 5 ng/ml in den letzten 24 Stunden der Fettsäuresupplementierung eingesetzt. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (qRT-PCR: N = 6, n = 3; ddPCR: N = 6, n = 1). Divergierende über den Balken abgebildete Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede.

4.3.2.4 Proliferations- und Differenzierungsfaktoren

Die GM-CSF-Expression war in Folge einer Zytokinstimulation signifikant erhöht. Die relative Quantifizierung mittels qRT-PCR erbrachte eine Steigerung der Expression auf das 594,8-fache (Abb. 8). Mittels absoluter Quantifizierung wurde eine Steigerung der Genexpression auf das 1209,5-fache des Ausgangswertes gemessen (Abb. 8). Auch bei Betrachtung unstimulierter, PUFA-supplementierter TIME zeigten sich sowohl mittels qRT-PCR als auch mittels ddPCR signifikante Unterschiede im Vergleich zur un-supplementierten Kontrolle. Die relative Quantifizierung indizierte eine signifikante Steigerung der GM-CSF-Expression bei Supplementierung von DHA auf das 1,4-fache und von LA auf das 1,6-fache im Vergleich zu un-supplementierten Zellen (Abb. 8). Mittels ddPCR wurde eine signifikante Steigerung der GM-CSF-Expression bei Supplementierung von LA (auf das 2,1-fache) sowie eine signifikante Reduktion bei Supplementierung von AA (auf das 0,3-fache) ermittelt (Abb. 8). In Folge der kombinierten Behandlung der TIME mit Zytokinen und Fettsäuren wurden durch beide Quantifizierungsverfahren signifikante Unterschiede bei Einsatz der Fettsäuren LNA, DHA und AA beobachtet. Gemessen mit der qRT-PCR zeigte sich in Bezug auf die stimulierte und un-supplementierte Kontrolle eine signifikante Erhöhung der Genexpression von GM-CSF bei Supplementierung von LNA (auf das 1,3-fache), EPA (auf das 1,6-fache) und AA (auf das 1,5-fache) (Abb. 8). Die DHA-Supplementierung der Zellen ging hingegen mit einer signifikanten Reduktion des Stimulationseffektes auf das 0,5-fache einher (Abb. 8). Im Gegensatz zu den qRT-PCR-Daten erbrachte die ddPCR-basierte Analyse für die Fettsäuren LNA, DHA und AA eine signifikante Reduktion des Zytokineffektes auf das 0,6-fache, 0,1-fach bzw. 0,4-fache des Wertes der stimulierten und un-supplementierten Kontrolle (Abb. 8).

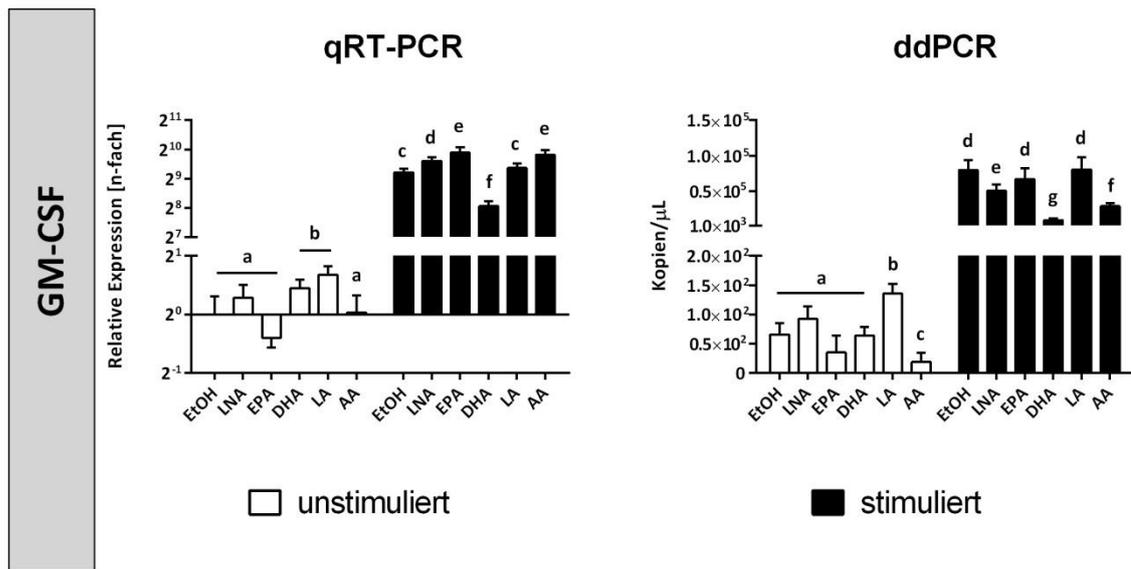


Abbildung 8: Gegenüberstellung der qRT-PCR- und ddPCR-Daten bezüglich der Fettsäuren- und Zytokin-induzierten Genexpressionsänderungen von GM-CSF

Die humanen Endothelzellen wurden für 144 Stunden mit den ungesättigten Fettsäuren LNA, EPA, DHA, LA oder AA (15 μ M gelöst in 0,1 Vol.-% EtOH) bzw. ausschließlich in Gegenwart von 0,1 Vol.-% EtOH (Kontrolle) kultiviert. Zur Stimulation wurden die Zytokine TNF- α , IL-1 β und INF- γ in Konzentrationen von je 5 ng/ml in den letzten 24 Stunden der Fettsäuresupplementierung eingesetzt. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (qRT-PCR: N = 6, n = 3; ddPCR: N = 6, n = 1). Divergierende über den Balken abgebildete Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede.

4.3.2.5 Chemokine

Die Genexpression von IL-8 war in Folge einer Zytokinbehandlung der Zellen signifikant gesteigert. Im Hinblick auf den alleinigen Stimulationseffekt ohne PUFA-Supplementierung war mittels qRT-PCR eine Erhöhung der IL-8-Expression auf das 1447,2-fache, mittels ddPCR eine Steigerung auf das 37,2-fache der Kontrolle zu beobachten (Abb. 9). Bei Betrachtung unstimulierter, PUFA-supplementierter TIME ergab die qRT-PCR-basierte Analyse eine signifikante Erhöhung der IL-8-Expression bei Supplementierung von LNA (auf das 1,4-fache) und LA (auf das 1,5-fache), verglichen mit der unstimulierten und unsupplementierten Kontrolle (Abb. 9). Zudem wurde bei EPA-Supplementierung eine signifikante Verminderung der Genexpression auf das 0,6-fache gemessen (Abb. 9). Die ddPCR ergab eine signifikante Reduktion der IL-8-Expression bei Supplementierung von EPA (auf das 0,4-fache) bzw. AA (auf das 0,3-fache) (Abb. 9). Bei Betrachtung der Effekte einer Zytokinstimulation bei gleichzeitiger PUFA-Supplementierung war die IL-8-Expression im Vergleich zu stimulierten und unsupplementierten Zellen laut qRT-PCR bei Supplementierung von LNA auf das 1,8-fache, von EPA auf das 1,9-fache, von LA auf das 1,4-fache und von AA auf das 2,1-fache erhöht (Abb. 9). Auch bei der ddPCR zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Genexpression durch LA (auf das 1,6-fache) im Vergleich zur stimulierten und unsupplementierten Kontrolle (Abb. 9). Im

Gegensatz zur qRT-PCR-basierten Analyse indizierte die ddPCR zudem eine signifikante Verminderung der IL-8-Expression in Folge einer DHA-Supplementierung (auf das 0,4-fache) sowie einer AA-Supplementierung (auf das 0,5-fache) (Abb. 9).

Die MCP-1-Expression war in Folge einer Zytokin-Stimulation signifikant erhöht. Die qRT-PCR erbrachte eine Steigerung der Expression auf das 262,8-fache, während bei der ddPCR eine Steigerung der Genexpression auf das 28,4-fache des Ausgangswertes gemessen wurde (Abb. 9). Bei Betrachtung der Auswirkungen einer PUFA-Supplementierung unstimulierter TIME indizierte die relative Quantifizierung eine signifikante Verminderung der MCP-1-Expression bei Supplementierung von EPA (auf das 0,4-fache), DHA (auf das 0,4-fache) und AA (auf das 0,5-fache) im Vergleich zur un-supplementierten Kontrolle (Abb. 9). Zudem wurde eine signifikante Steigerung der Genexpression von MCP-1 unter LA-Supplementierung auf das 1,4-fache des Wertes unstimulierter und un-supplementierter Zellen gemessen (Abb. 9). In Übereinstimmung mit den qRT-PCR-Daten ergab die ddPCR-Analyse eine signifikante Reduktion der Genexpression von MCP-1 in Folge einer Supplementierung unstimulierter Zellen mit den Fettsäuren EPA (auf das 0,2-fache), DHA (auf das 0,2-fache) und AA (auf das 0,1-fache) (Abb. 9). Die kombinierte Behandlung der TIME mit Zytokinen und Fettsäuren resultierte entsprechend den Daten der qRT-PCR in einer signifikanten Erhöhung der Genexpression auf das 1,8-fache des Wertes stimulierter und un-supplementierter Zellen bei Anreicherung von LNA (Abb. 9). Im Gegensatz hierzu indizierte die ddPCR-basierte Analyse eine signifikante Verminderung des Zytokineffektes bei Supplementierung der Zellen mit den Fettsäuren LNA (auf das 0,7-fache), EPA (auf das 0,5-fache), DHA (auf das 0,2-fache) und AA (auf das 0,2-fache) (Abb. 9).

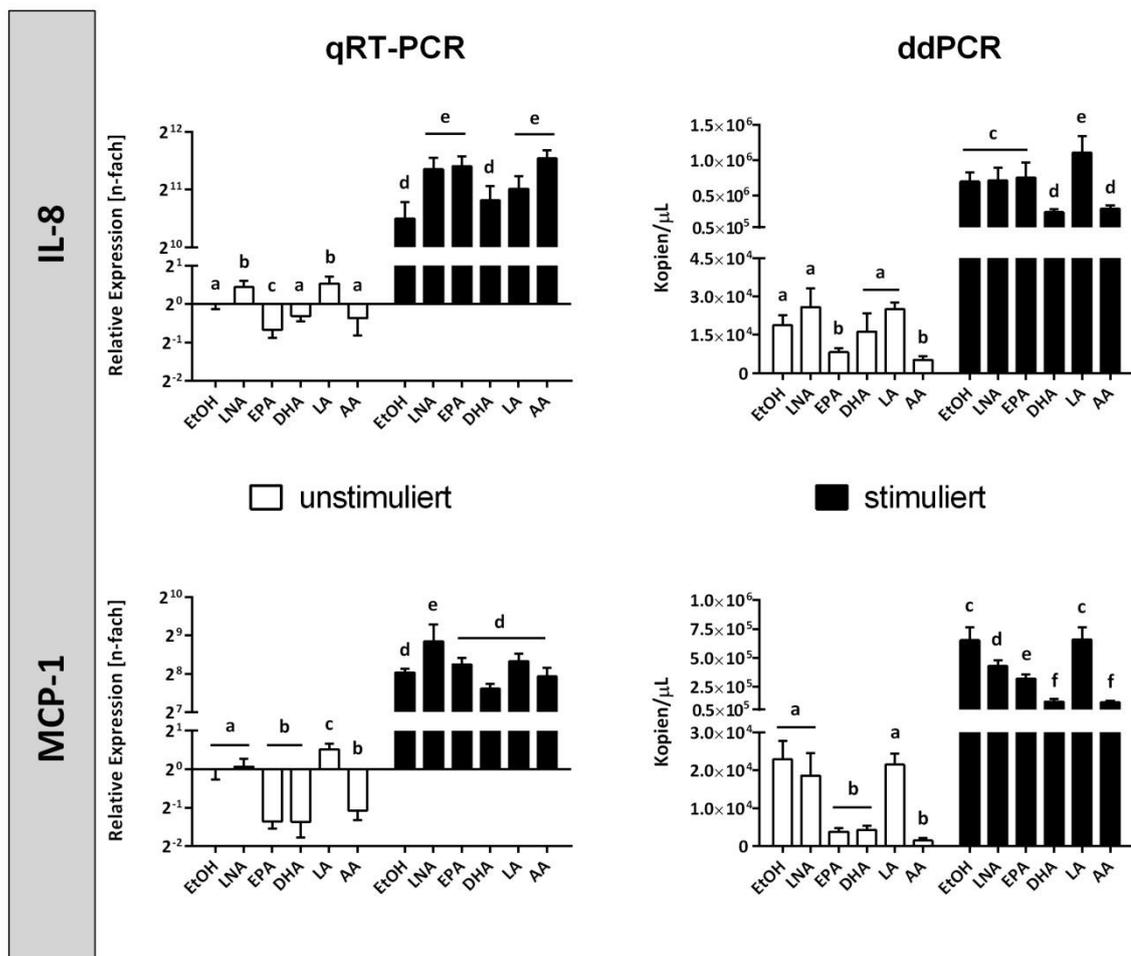


Abbildung 9: Gegenüberstellung der qRT-PCR- und ddPCR-Daten bezüglich der Fettsäuren- und Zytokin-induzierten Genexpressionsänderungen von IL-8 und MCP-1

Die humanen Endothelzellen wurden für 144 Stunden mit den ungesättigten Fettsäuren LNA, EPA, DHA, LA oder AA (15 µM gelöst in 0,1 Vol.-% EtOH) bzw. ausschließlich in Gegenwart von 0,1 Vol.-% EtOH (Kontrolle) kultiviert. Zur Stimulation wurden die Zytokine TNF-α, IL-1β und INF-γ in Konzentrationen von je 5 ng/ml in den letzten 24 Stunden der Fettsäuresupplementierung eingesetzt. Die Messwerte sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt (qRT-PCR: N = 6, n = 3; ddPCR: N = 6, n = 1). Divergierende über den Balken abgebildete Buchstaben symbolisieren signifikante Unterschiede.

4.3.3 Vergleich der Daten von qRT-PCR und ddPCR bei Ansatz 1

Bei sechs von acht Zielgenen ergab sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse in Bezug auf das Vorliegen und die Richtung des gemessenen Effektes. So indizierten sowohl qRT-PCR als auch ddPCR bei den Zielgenen Adra1b, Adra1d, ACE1, ATIP1 und EdnrB in Folge der Zellstimulation eine signifikante Reduktion der Genexpression und beim Zielgen ATRAP eine signifikante Steigerung der Genexpression (Abb. 10). Bei EdnrA zeigte sich bei beiden Methoden eine Reduktion, welche jedoch nur im Falle der qRT-PCR signifikant war (Abb. 10.) Widersprüchliche Daten wurden bei Adrb2 erzielt. Während die qRT-PCR eine signifikante Reduktion anzeigte,

ergab sich im Rahmen der ddPCR-basierten Analyse eine nicht-signifikant gesteigerte Genexpression (Abb. 10).

Die Gegenüberstellung der durch qRT-PCR und ddPCR indizierten Effektausmaße (= Ratio zwischen stimulieren und unstimulierten Proben) erbrachte bei den Zielgenen Adra1b, ATIP1 und ATRAP ein hohes Maß an Kongruenz. Der Prozentfaktor, kalkuliert aus dem Verhältnis des durch qRT-PCR bzw. ddPCR indizierten Effektausmaßes, betrug für Adra1b, ATIP1 sowie ATRAP jeweils 1,3. Im Gegensatz dazu ergaben sich bei Adra1d, ACE1 und EdnrB deutliche Abweichungen, welche sich in einem Prozentfaktor ≥ 3 widerspiegeln (Adra1d: 3,6; ACE1: 3,0; EdnrB: 3,2). Wie in Abbildung 10 ersichtlich lassen sich diese Diskrepanzen nicht auf eine generelle Über- oder Unterschätzung des Effektes durch eines der beiden Analyseverfahren zurückführen. Vielmehr sind die Unstimmigkeiten zwischen qRT-PCR und ddPCR auf jene Zielgene beschränkt, bei deren Analyse Messwerte an den Grenzen der dynamischen Reichweiten der Verfahren, d.h. CT-Werte > 28 bzw. Kopienzahlen/ μl < 10 erzielt wurden.

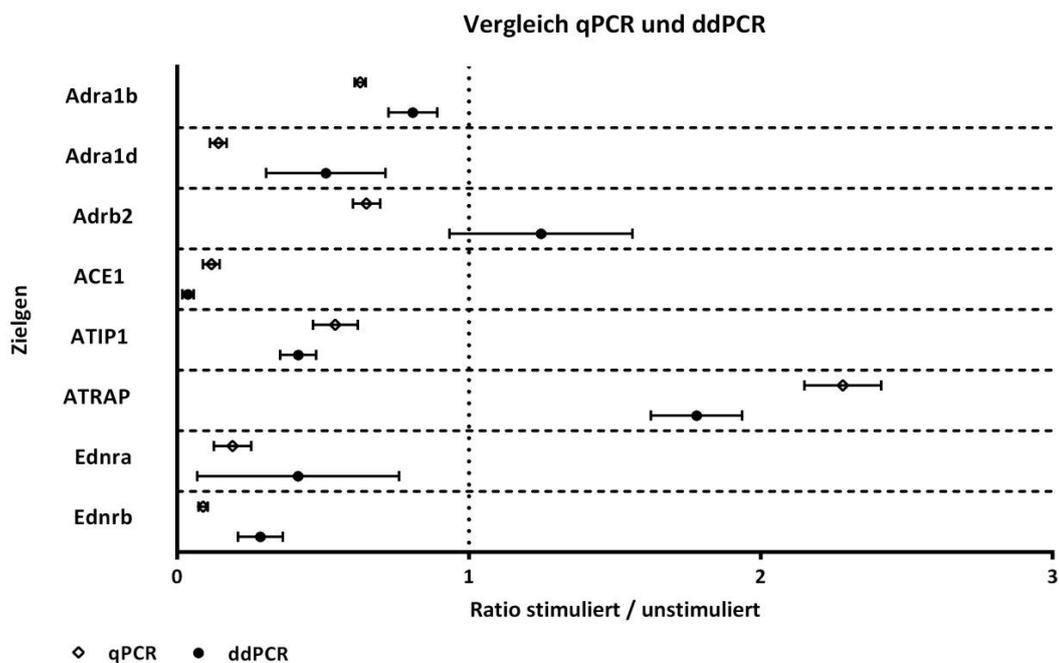


Abbildung 10: Vergleich der qRT-PCR- und ddPCR-Daten von Ansatz 1 bezüglich indizierter Effektrichtung und ermitteltem Effektausmaß

Dargestellt sind die Ratios der Genexpression zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen, gemessen durch qRT-PCR und ddPCR. Der Ratio-Wert von 1 (entspricht einer fehlenden Zytokin-induzierten Genexpressionsänderung) wird durch eine vertikale unterbrochene Linie hervorgehoben. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (qRT-PCR: N = 5, n = 9; ddPCR: N = 5, n = 3).

Bei einer Effizienz der PCR-Reaktion von 100 % (Idealbedingung; unter Laborbedingungen ist eine PCR-Effizienz von 90-100% dokumentiert [150,151]) ist pro Zyklus eine Verdopplung des

Amplifikats zu erwarten. Eine Verminderung des CT-Wertes um den Faktor 1 (z.B. von CT=25 auf CT=24) würde bei idealen Bedingungen somit einer Verdopplung (2^1) und eine Verminderung des CT-Wertes um den Faktor 2 (z.B. von CT=25 auf CT=23) einer Vervierfachung (2^2) der Amplifikatmenge entsprechen. Die Auftragung der mittels ddPCR gemessenen Kopienzahlen/ μL gegen die mittels qRT-PCR gemessenen CT-Werte sollte demnach eine negativ-exponentielle Korrelation ergeben. Diese zu erwartende negativ-exponentielle Korrelation liegt bei Ansatz 1 vor (Abb. 11). Aus Abbildung 11 geht zudem hervor, dass einzelne Messwerte deutlich vom Idealverlauf abweichen können. Es ist nicht möglich, aus dem gemessenen CT-Wert mit ausreichender Genauigkeit die Anzahl der Genkopien abzuleiten. Der durch die qRT-PCR erhaltene CT-Wert erlaubt demzufolge lediglich eine grobe Abschätzung der Abundanz eines Zielgens. Um die Konzentration der Kopienanzahl eines Zielgens in einer Probe zu bestimmen, ist es zwingend erforderlich eine ddPCR durchzuführen.

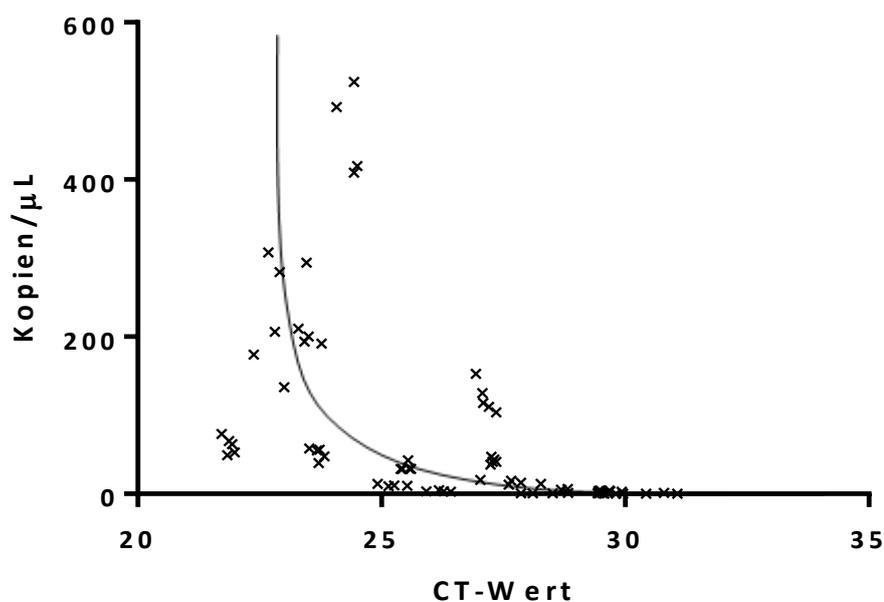


Abbildung 11: Korrelation der Messwerte der qRT-PCR und der ddPCR von Ansatz 1

Dargestellt sind die ermittelten Mittelwerte der Kopien/ μL der ddPCR-Analyse in Gegenüberstellung zu den Mittelwerten der CT-Werten der qRT-PCR-Analyse. Zusätzlich wurde eine nonlineare Regressionskurve ermittelt und in die Grafik eingefügt, die den zweiphasigen negativ-exponentiellen Charakter der Korrelation darstellt.

4.3.4 Vergleich der Daten von qRT-PCR und ddPCR bei Ansatz 2

Die qRT-PCR-Analyse und die ddPCR-Analyse erbrachten bei allen Zielgenen beim Vergleich stimulierter Endothelzellen zur unstimulierten Kontrolle übereinstimmende Ergebnisse in Bezug auf das Vorliegen und die Richtung des gemessenen Stimulationseffektes. Bei zehn der elf untersuchten Zielgene wurde durch beide Methoden ein signifikanter Anstieg der

Genexpression in Folge der Stimulation indiziert (Abb. 12). Und bei einem der elf untersuchten Zielgene (vWF) ergaben sowohl qRT-PCR als auch ddPCR eine signifikante Reduktion der Genexpression (Abb. 12).

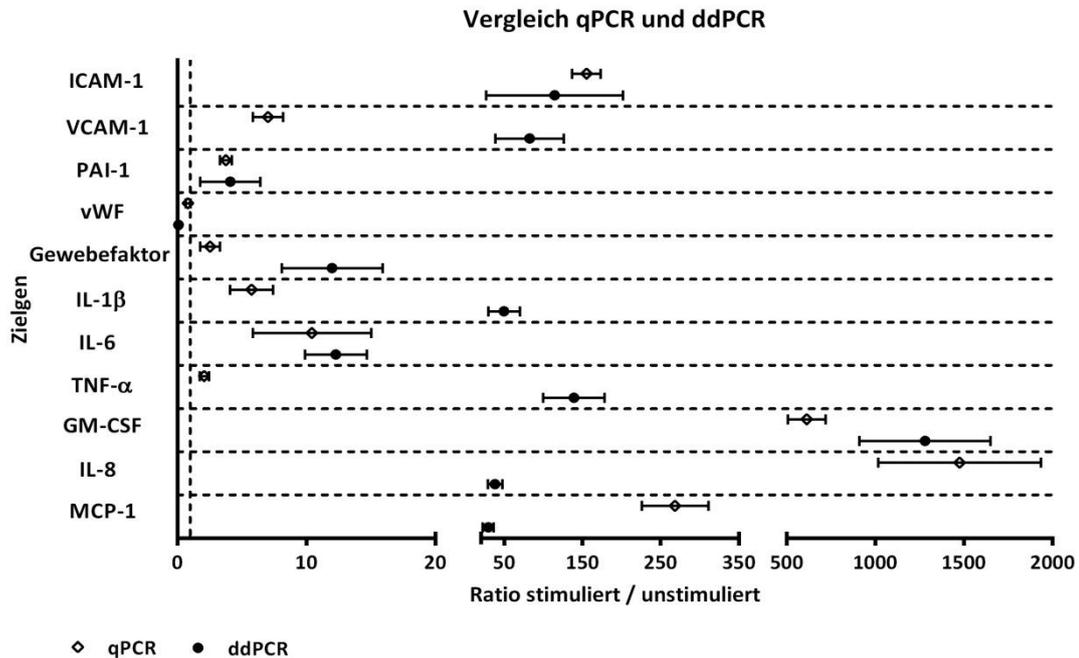


Abbildung 12: Vergleich der qRT-PCR- und ddPCR-Daten bezüglich der Zytokin-induzierten Genexpressionsänderungen von Ansatz 2

Dargestellt sind die Ratios der Genexpression zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen, gemessen durch qRT-PCR und ddPCR. Der Ratio-Wert von 1 (entspricht einer fehlenden Zytokin-induzierten Genexpressionsänderung) wird durch eine vertikale unterbrochene Linie hervorgehoben. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (qRT-PCR: N = 6, n = 3; ddPCR: N = 6, n = 1).

Unterschiede traten in Bezug auf das angezeigte Ausmaß des Effektes auf. Bei Betrachtung der Folgen der Stimulation ergab sich im Fall von ICAM-1, PAI-1 und IL-6 eine Übereinstimmung des durch qRT-PCR und ddPCR indizierten Effektausmaßes. Der kalkulierte Prozentfaktor für das Verhältnis des durch qRT-PCR bzw. ddPCR indizierten Effektausmaßes betrug für ICAM-1 1,4, für PAI-1 1,1 und für IL-6 1,2. Bei zwei der elf untersuchten Zielgene trat hingegen eine Abweichung im indizierten Effektausmaß in einer Dimension größer Prozentfaktor 2 (TF: 4,7; GM-CSF: 2,1), bei drei untersuchten Zielgenen größer Prozentfaktor 5 (vWF: 9,2; IL-1 β : 8,6; MCP-1: 9,2) und bei drei weiteren Zielgenen größer Prozentfaktor 10 (VCAM-1: 11,7; TNF- α : 66,8; IL-8: 38,7) auf (Abb. 12).

Der Vergleich der qRT-PCR- und ddPCR-Daten PUFA-supplementierter TIME erbrachte in 73% der Gegenüberstellungen eine Übereinstimmung in Bezug auf das Vorliegen und die Richtung des gemessenen Effektes. Im Hinblick auf das ermittelte Ausmaß der Folgen einer PUFA-

Supplementierung waren die Ergebnisse von qRT-PCR und ddPCR in 22% der Fälle kongruent. Bei 24% der Analysen wurde hingegen eine Abweichung größer Prozentfaktor 2, bei 20% der Analysen größer Prozentfaktor 5 und bei 34% der Analysen größer Prozentfaktor 10 beobachtet. Analog zu Ansatz 1 wurde auch bei Ansatz 2 keine Tendenz für eine durchgehende Über- oder Unterschätzung des Effektausmaßes durch eines der beiden Amplifikationsverfahren festgestellt. Ebenso zeigte sich in Übereinstimmung zu Ansatz 1, dass Diskrepanzen im indizierten Effektausmaß jene Zielgene betraf, deren CT-Werte bzw. Kopienzahlen an den Grenzbereichen bzw. außerhalb der dynamischen Reichweite der genutzten Verfahren lagen, d.h. bei CT-Werten > 28 bzw. Kopienzahlen/ $\mu\text{l} < 10$. Die Auftragung der ermittelten CT-Werte gegen die ermittelten Kopienzahlen der Proben ergab wie in Ansatz 1 die zu erwartende negativ-exponentielle Korrelation (Abb. 13). Der Vergleich der für Ansatz 1 und Ansatz 2 ermittelten Regressionskurven zeigt zudem, dass die mittels qRT-PCR gemessenen CT-Werte nicht mit festen Kopienanzahlen/ μl korrelieren.

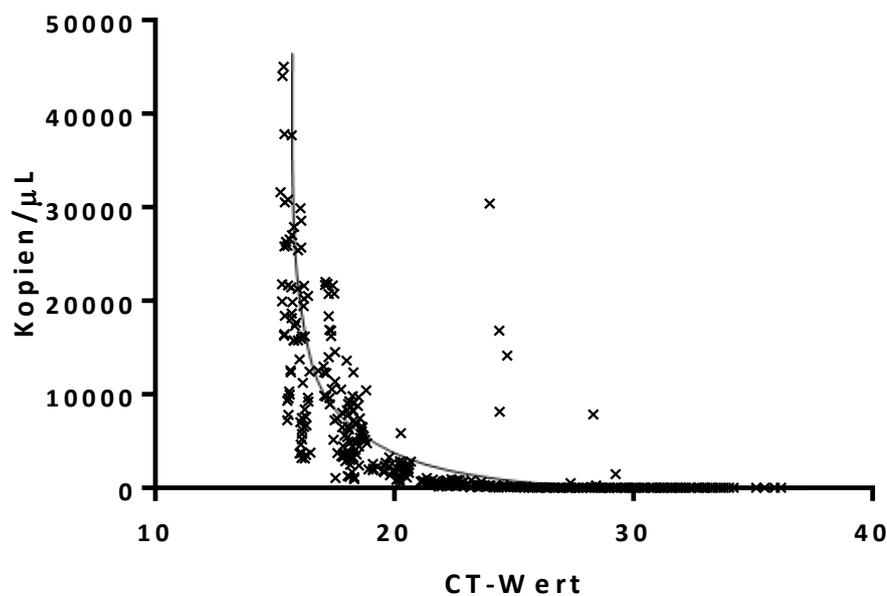


Abbildung 13: Korrelation zwischen Werten der Kopien/ μl und CT von Ansatz 2

Dargestellt sind die ermittelten Mittelwerte der Kopien/ μl der ddPCR-Analyse in Gegenüberstellung zu den Mittelwerten der CT-Werten der qRT-PCR-Analyse. Zusätzlich wurde eine nonlineare Regressionskurve ermittelt und in die Grafik eingefügt, die den zweiphasigen negativ-exponentiellen Charakter der Korrelation darstellt.

5 Diskussion

Die absolute Quantifizierung mittels ddPCR ist seit dem Jahr 2011 kommerziell verfügbar und wird unterdessen in zunehmendem Maß angewendet. Dennoch zeigt sich auch fast 10 Jahre nach Einführung dieses Verfahrens eine Studienlage, auf deren Basis keine klare Empfehlung für oder gegen die ddPCR im Vergleich zu länger erprobten Amplifikationsverfahren wie der qRT-PCR gegeben werden kann. Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Dissertation zu zeigen, ob die Daten von qRT-PCR und ddPCR miteinander vergleichbar sind und auf welche Art die Ergebnisse miteinander korrelieren. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob eine der beiden durchgeführten Methoden gegenüber der jeweils anderen bei bestimmten Anwendungsbereichen eine Überlegenheit zeigt.

5.1 Versuchsdesign

In der vorliegenden Arbeit wurde die Telomerase-immortalisierte Endothel-Zelllinie TIME verwendet. Die Auswahl dieser Zellen erfolgte aufgrund ihrer Stabilität in Bezug auf charakteristische Expressionsmuster mikrovaskulärer endothelialer Zellen, wie beispielsweise Unterscheidungsgruppe 31 (engl. cluster of differentiation 31, CD31) oder $\alpha V\beta 3$ -Integrin, auch nach mehr als 25 Populations-Verdopplungen [26].

Zur Stimulation der TIME wurde ein pro-inflammatorisch wirksames Zytokingemisch bestehend aus TNF- α , IL-1 β und INF- γ in zwei verschiedenen Konzentrationsbereichen eingesetzt: in Ansatz 1 wurden Konzentrationen von je 100 ng/ml, in Ansatz 2 Konzentrationen von je 5 ng/ml verwendet. Konzentrationen von 100 ng/ml liegen oberhalb des in vorherigen Studien festgestellten Niveaus im Serum, jedoch wurden bereits ähnlich hohe Konzentrationen dieser pro-inflammatorischen Botenstoffe bei lokalen und systemischen Entzündungen im lokalen Zellmilieu oder anderen Untersuchungsmedien wie z.B. Zerebrospinalflüssigkeit ermittelt [152,153]. Der Konzentrationsbereich um 5 ng/ml entspricht Werten dieser pro-inflammatorischen Zytokine im lokalen Milieu verschiedener Zelltypen wie z.B. peripheren mononukleären Blutzellen im Rahmen einer gramnegativen Septikämie [154] oder in Sputumproben von Patienten mit akutem Lungenversagen (engl. acute respiratory distress syndrom, ARDS) [155]. Im Ansatz 2 wurden die TIME zudem für 144 h mit PUFA supplementiert. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass es in diesem Zeitrahmen zu einem Einbau der supplementierten PUFA in die Zellmembran sowie zu einer Zunahme des sogenannten Methylen-Brücken-Index (engl. methylene bridge index, MBI) kommt, welcher ein Indikator für die Desaturation einer Fettsäuresuspension ist [144]. Die verwendete

Konzentration der PUFA von 15 $\mu\text{mol/l}$ befindet sich im physiologischen Bereich der Plasmaserum-Werte von gesunden Probanden, welche eine nutritive orale Therapie mit Fischöl-Kapseln erhalten [156,157].

Sowohl die RNA-Isolation aus den gewonnenen Zelllysaten als auch die Bestimmung der RNA-Menge innerhalb der Proben wurde standardisiert und nach Angaben der jeweiligen Hersteller durchgeführt [148]. Zur Bestimmung der RNA-Menge und -Reinheit wurde das Spektrophotometer NanoVue verwendet. Die spektrophotometrische Bestimmung von RNA-Menge und -Reinheit zeigte sich in vergangenen Studien sowohl für die qRT-PCR [158,159] als auch für die ddPCR [160–162] als suffizient und valide. Das Risiko für fehlerhafte Messungen wurde durch strikt standardisiertes Vorgehen und eine gründliche Reinigung vor jeder Probenauslesung minimiert.

In Bezug auf die verwendeten Primerpaare wurden für beide Quantifizierungsverfahren die gleichen Oligonukleotidprimer in identischer Konzentration innerhalb des erzeugten Mastermix verwendet. Zur Erzielung einer möglichst hohen Primerspezifität und -effektivität wurde eine PCR-Produktlänge von 90-300 bp und eine möglichst geringe maximale Schmelztemperatur-Differenz ausgewählt. Zur Reduktion des Risikos der Schleifenbildung der ermittelten Primer wurden jene Oligonukleotidsequenzen innerhalb des Programms der Primersynthese [149] ausgewählt, bei denen der Temperaturbereich für eine Loop-Bildung und die jeweilige Annealing-Temperatur weit auseinanderlagen. Im Rahmen der Primeretablierung wurden überdies Schmelzkurvenanalysen und Gelelektrophoresen durchgeführt, um ein Vorhandensein von Nebenamplifikaten zur gewünschten Zielsequenz auszuschließen.

Im Hinblick auf die beiden Quantifizierungsverfahren wurde auf eine hohe Vergleichbarkeit bei der Durchführung geachtet. Es wurden bis auf die verfahrensspezifischen vorgefertigten Supermix-Lösungen für beide Amplifikationsmethoden die gleichen Reagenzien und Materialien verwendet. Sowohl für die qRT-PCR als auch für die ddPCR kamen identische Konzentrationen von Primern, cDNA und Aqua a.i. zum Einsatz. Ebenso wurden die Negativ- und Positivkontrollen kongruent gewählt. Zudem wurde darauf geachtet, die Programme der genutzten Thermozykler für qRT-PCR und ddPCR zu standardisieren und einander anzugleichen (vgl. Tabelle 2 und 3). Hierdurch sollten Beeinträchtigungen in der Vergleichbarkeit der Ergebnisse minimiert werden. Zur Präzisierung der Pipettiertechnik wurde vor Beginn der Versuchsreihe ein zweiwöchiges Pipettiertraining unter Zuhilfenahme einer Präzisions-Analysewaage durchgeführt.

5.2 Folgen eines pro-inflammatorischen Milieus

5.2.1 Ansatz 1

Im Hinblick auf die α_1 -Adrenorezeptoren zeigten die Resultate beider Quantifizierungsmethoden in die gleiche Richtung: unter Einfluss von TNF- α , IL-1 β und INF- γ kam es sowohl bei Adra1b als auch bei Adra1d zu einer Reduktion der Genexpression. Dies deutet in Übereinstimmung zu Ergebnissen anderer Studien darauf hin, dass der vasokonstriktive Effekt der α -Adrenorezeptoren in entzündeten Gebieten des Endothelzellverbands herabgesenkt und damit einhergehend eine Weitstellung der Gefäße und eine Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen ausgelöst wird [163–165]. Die daraus entstehende Zunahme des trans- und paravasalen Flusses begünstigt in inflammatorisch veränderten Geweben das Anfluten von löslichen Zytokinen sowie zellulären Komponenten des Immunsystems [166]. Im Hinblick auf Adrb2 zeigte sich im Rahmen der qRT-PCR eine signifikante Reduktion, bei der ddPCR hingegen eine nicht-signifikante Steigerung der Genexpression nach Zytokinstimulation. Eine Steigerung von β -Adrenorezeptoren-Aktivität ließ sich in ähnlichen Versuchen mit einer vermehrten Proliferation und Differenzierung von Immunzellen in Einklang bringen [167,168]. Die hohen verwendeten Zytokinkonzentrationen von 100 ng/ml befinden sich jedoch außerhalb der sonst erfassten Plasma-Serumwerte von TNF- α , IL-1 β und INF- γ . Dies könnte im Rahmen einer inflammatorisch bedingten Apoptosereaktion der Endothelzellen auch eine Suppression der Genexpression erklären, wie es in diesem Falle im Rahmen der qRT-PCR festzustellen war [169].

Bei den Angiotensin-assoziierten Proteinen zeigten qRT-PCR und ddPCR kongruente Ergebnisse. Im Fall von ACE1 und ATIP1 wurde eine signifikante Reduktion der Genexpression mittels beider Verfahren festgestellt. Die Reduktion der ACE1-Expression geht mit einer Herabsetzung der enzymvermittelten Spaltung von Bradykinin einher, wodurch die Stickstoffmonoxid-abhängige Gefäßdilatation gesteigert wird [170]. ACE1 hat zudem einen direkten positiven Einfluss auf die Menge an vorhandenem Angiotensin II, welches wiederum einen steigernden Effekt auf die Gefäßpermeabilität hat [171]. Darüber hinaus verstärkt Angiotensin II die Stimulation der Synthese von pro-inflammatorischen Serie-II-Prostaglandinen sowie des pro-angiogenetischen Faktors VEGF [31,32]. In anderen Studien wurde gezeigt, dass Angiotensin II die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche verstärkt und damit einen steigernden Einfluss auf die Diapedese besitzt [33]. Die Hemmung der ACE1-Expression nimmt also eine anti-inflammatorische Rolle innerhalb der Entzündungsreaktion ein. ATIP1 hat im physiologischen Setting einen hemmenden Einfluss auf den Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 2. Eine Verminderung der Expression von ATIP1 zeigte sich

unter Inflammation bereits in mehreren Studien und markiert einen pro-inflammatorischen Weg der Entzündungsreaktion, welcher die Diapedese, die Sezernierung von inflammatorischen Interleukinen wie IL-6 und IL-8 und die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 fördert [172–174]. ATRAP besitzt ähnlich wie ATIP1 hemmende Funktionen auf den Angiotensin-II-Rezeptor, allerdings nur in Anwesenheit von Angiotensin-II. Im Rahmen der Versuche konnte eine signifikante Steigerung der Genexpression dieses Zielgens festgestellt werden. Dies zeigt anders als bei ATIP1 an, dass ATRAP vor allem eine anti-inflammatorische Rolle im Rahmen der Entzündungsreaktion einnimmt [175]. Dies konnte auch in anderen Zelltypen wie z.B. Adipozyten gezeigt werden [176].

Für die Endothelin-Rezeptoren A und B wurde übereinstimmend bei beiden Amplifikationsverfahren eine Reduktion der Genexpression ermittelt. Im Fall von EdnrB war die Reduktion sowohl bei der qRT-PCR als auch bei der ddPCR signifikant. Im Fall von EdnrA ergab sich im Rahmen der qRT-PCR eine signifikante Reduktion, bei der ddPCR hingegen aufgrund einer hohen Streuung der Werte lediglich ein Trend. Eine Reduktion der Genexpression von Endothelin-Rezeptoren stimmt mit der aktuellen Studienlage überein und lässt sich mit einer Verminderung der Vasokonstriktion unter inflammatorischen Bedingungen in Einklang bringen [177]. Die dilatierende Wirkung auf das lokale Gefäßbett spricht - in Analogie der Effekte bei den α -Adrenorezeptoren - für eine inflammatorisch bedingte Zunahme der Paravasation.

5.2.2 Ansatz 2

Bei Betrachtung der untersuchten Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 zeigten sich bei beiden genutzten Analyseverfahren kongruente Effekte einer Stimulation mit TNF- α , IL-1 β und INF- γ . Bei beiden Zielgenen wurde eine deutliche Steigerung der Genexpression festgestellt. ICAM-1 und VCAM-1 steigern die Diapedese von Leukozyten und Zytokinen durch das Endothel in subkutane Gewebe während einer Entzündungsreaktion [56,57]. Die Erhöhung der Genexpression bedeutet, dass innerhalb der pro-inflammatorischen Reaktion vermehrt Komponenten des Immunsystems zum Ort der Entzündung gelangen können, um dort zur Bekämpfung von Pathogenen wie Bakterien, Viren oder Pilzen zur Verfügung zu stehen. Der Stimulationseffekt auf die ICAM-1-Expression wurde den Ergebnissen beider Untersuchungsmethoden zufolge bei Supplementierung von LA oder LNA signifikant verstärkt. Es ist bekannt, dass die Omega-6-Fettsäure LA über die Bildung von Serie-II-Prostaglandinen entzündungsfördernde Effekte auf Endothelzellen ausüben kann [178,127]. In der wissenschaftlichen Literatur finden sich überdies Belege, dass die Omega-3-Fettsäure LNA in den ersten 24 Stunden einer Entzündungsreaktion die Infiltration mit pro-inflammatorischen Zytokinen und Immunzellen fördert, während in der nachfolgenden Periode ein eher anti-

inflammatorischer Effekt zu beobachten ist [179]. Dies steht in Einklang mit der beobachteten Expressions-Erhöhung von ICAM-1 durch LNA-supplementierte Zellen nach 24-stündiger Stimulation. Interessanterweise zeigte sich bei DHA-supplementierten Zellen eine signifikante Reduktion des Zytokineffektes. Dies spricht für eine protektive Wirkung von DHA als Vertreter der Omega-3-Fettsäuren in Anwesenheit einer lokalen Entzündungsreaktion und konnte auch anderweitig bereits bestätigt werden [180,181]. Bei der absoluten Quantifizierung mittels ddPCR wurde eine signifikante Reduktion der ICAM-1-Expression auch bei AA-supplementierten Zellen festgestellt. Dies erscheint zunächst konträr zu den postulierten pro-inflammatorischen Eigenschaften von Omega-6-Fettsäuren über die Bildung von Serie-II-Prostaglandinen. Es ist allerdings bereits durch andere Studien bekannt, dass erhöhte Plasmawerte von AA mit einer Reduktion pro-inflammatorischer Botenstoffe, wie IL-6 und dem Tumor-Wachstumsfaktor β (engl. tumor growth factor β , TGF- β), einhergehen [182]. Auch bei VCAM-1 zeigte sich eine deutliche Reduktion des Zytokineffektes bei Supplementierung der Zellen mit EPA, DHA und AA, wobei die Wirkung von AA im Vergleich zu den PUFA EPA und DHA mild ausfiel. Im Rahmen der ddPCR wurde zudem ein signifikanter Reduktionseffekt durch LNA indiziert. Die erzielten Daten stehen im Einklang mit weiteren Studien, welche einen anti-inflammatorischen Effekt der Omega-3-Fettsäuren LNA, EPA und DHA erfassen konnten [179,182,183].

Bei den Koagulationsfaktoren konnte im Rahmen der Versuche durch beide Analyseverfahren eine signifikante Steigerung der Expression von PAI-1 und TF vermerkt werden, während vWF eine signifikante Reduktion unter Zytokinstimulation zeigte. Die Reduktion der vWF-Expression kann im Rahmen der Entzündungsreaktion damit erklärt werden, dass in der Anfangsphase die thrombolytische Komponente der Gerinnungskaskade überwiegt, um den Fluss der Blutbestandteile in entzündete Gewebe voranzutreiben. Die Steigerung von PAI-1 hat im Gegensatz zu vWF eine prothrombotische Wirkung, welche die späte inflammatorische oder postinflammatorische Phase der Geweberegeneration unterstützt [184,185]. Die Funktionen von TF bei der Proliferations- und Differenzierungsförderung von Leukozyten, der Apoptosehemmung von Immunzellen und der Bildung neuer Gefäße erklärt sowohl in der Früh- als auch in der Spätphase der Entzündung seine Genexpressionssteigerung [64]. Im Hinblick auf die PUFA-Supplementierung zeigte sich bei PAI-1 eine signifikante Reduktion des Zytokineffektes unter der Omega-3-Fettsäure DHA und unter der Omega-6-Fettsäure AA (Daten qRT-PCR) bzw. bei allen getesteten PUFA (Daten ddPCR), wobei auch hier die stärksten PUFA-Effekte für DHA und AA ermittelt wurden. Ebenfalls eine zum Zytokineffekt gegenläufige PUFA-Wirkung wurde übereinstimmend durch beide genutzte Verfahren bei der Analyse der Genexpression von vWF ermittelt. Bei TF waren die Folgen einer PUFA-Supplementierung

stimulierter Zellen hingegen von der Art der supplementierten Fettsäure abhängig. Es zeigte sich eine weitere Amplifikationssteigerung unter LNA und LA sowie laut qRT-PCR auch unter AA [186]. Gleichzeitig wurde unter EPA- und DHA-Supplementierung eine Reduktion des Zytokineffektes festgestellt. Eine Minderung der Zytokinwirkung wurde im Rahmen der ddPCR zudem für AA festgestellt. Insgesamt wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass insbesondere durch DHA und EPA die inflammatorische Steigerung der Genexpression von PAI-1 und TF gesenkt wird [187,188].

Bei den drei betrachteten pro-inflammatorischen Botenstoffen IL-1 β , IL-6 und TNF- α zeigte sich bei beiden Analysenmethoden eine signifikante Steigerung der Genexpression nach erfolgter Zytokinstimulation. Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen zahlreicher anderer Versuchsreihen [189–195]. Die PUFA-Supplementierung bewirkte bei IL-1 β laut qRT-PCR im Fall von LNA, DHA und AA eine signifikante Reduktion des Zytokineffektes. Die ddPCR indizierte bei allen untersuchten PUFA eine signifikante Minderung des Zytokineffektes, wobei die deutlichste Reduktion sich auch hier bei DHA und AA zeigte. Es ist hervorzuheben, dass PUFA-Effekte vorrangig unter inflammatorischen Bedingungen, nicht aber bei unstimulierten Endothelzellen auftraten. Dies lässt darauf schließen, dass die PUFA nicht a priori anti-inflammatorisch wirken, sondern der protektive Effekt erst nach Initiierung einer endothelialen Entzündungsreaktion einsetzt [196–198]. In Übereinstimmung zu den für IL-1 β erzielten Daten wurde im Rahmen der ddPCR-basierten Analyse auch bei IL-6 ein hemmender Effekt der PUFA LA, LNA und DHA auf die Zytokinwirkung festgestellt. Die Inhibition des Zytokineffektes auf die IL-6-Expression zeigte sich für DHA auch im Rahmen der qRT-PCR-Analyse und steht in Einklang mit Beobachtungen anderer Studien [199,121]. Allerdings wurde mittels qRT-PCR eine Steigerung der IL-6-Expression durch EPA und AA angezeigt, was speziell mit Blick auf die Omega-3-Fettsäure EPA konträr zu anderen Studienergebnissen steht. Für TNF- α wurde bei beiden Analysemethoden übereinstimmend bei allen getesteten PUFA eine Inhibition der Zytokinwirkung festgestellt, wobei auch hier DHA durch die größte Effektstärke gekennzeichnet war. Zusammenstellend mit den weiteren Ergebnissen der vorliegenden Arbeit spricht dies für einen anti-inflammatorischen Effekt der PUFA, speziell von DHA, in der Initialphase einer Entzündung des Endothels [200–202].

Beim Proliferations- und Differenzierungsfaktor GM-CSF zeigte sich unter Betrachtung beider Verfahren eine signifikante Steigerung der Genexpression durch pro-inflammatorische Stimulation. Im Zusammenspiel von Stimulation und PUFA-Supplementierung stellte sich ein differenziertes Bild dar. Für die Omega-3-Fettsäure DHA ergab sich übereinstimmend bei qRT-PCR und ddPCR eine signifikante Hemmung des Stimulationseffektes. Auch unter LNA und AA indizierte die ddPCR eine signifikante Reduktion der Expression. Bei der qRT-PCR zeigte sich

hingegen eine Expressionssteigerung unter LNA, EPA und AA. Diese widersprüchlichen Daten lassen sich möglicherweise darauf zurückführen, dass die Messwerte bei beiden Verfahren außerhalb der linearen dynamischen Reichweite lagen [203].

Bei den beiden Chemokinen IL-8 und MCP-1 wurde unter Zytokinstimulation eine signifikante Genamplifikationssteigerung festgestellt. Diese Erhöhung der beiden Chemokine repräsentiert vermutlich eine verstärkte Anlockung von Immunzellen im entzündlich veränderten Gewebe entlang eines Konzentrationsgradienten im Rahmen der Pathogenese, um dort eine effiziente Bekämpfung von Pathogenen zu erreichen [91,93]. Der Stimulationseffekt auf die IL-8-Expression war laut qRT-PCR bei LNA-, EPA-, LA- und AA-supplementierten Zellen weiter gesteigert. Die Ergebnisse der ddPCR differierten hierzu. Laut ddPCR war eine weitere Steigerung der Genexpression nur bei LA zu verzeichnen, wohingegen es bei Supplementierung von DHA bzw. AA zu Inhibition des Zytokineffektes kam. Der Blick in die wissenschaftliche Literatur zeigt, dass sowohl eine Steigerung als auch eine Reduktion der Expression von IL-8 durch AA durch aktuelle Studien gestützt werden kann [126,204]. Bei Betrachtung von MCP-1 konnte bei beiden Verfahren eine signifikante Reduktion der Amplifikation unter EPA, DHA und AA beobachtet werden, wobei diese bei der qRT-PCR jedoch ausschließlich in Abwesenheit einer Zytokinstimulation auftrat. In Tierversuchen konnte ebenfalls eine Reduktion der Genexpression von MCP-1 unter Supplementierung von EPA und DHA gezeigt werden, allerdings zeigte sich diese Transkriptionsverminderung unter vorheriger Stimulation mittels TNF- α [205].

5.3 Gegenüberstellung von qRT-PCR und ddPCR

Im Zusammenblick aller erfassten Ergebnisse zeigte sich eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Daten der qRT-PCR und den Daten der ddPCR. Die Übereinstimmung der Effektrichtung war mit Ausnahme eines getesteten Gens (*Adrb2*) in allen Fällen gegeben. Das entspricht einer Übereinstimmungsrate von 94,7%. Differenzierter fällt das Urteil in Bezug auf das indizierte Ausmaß der Effekte aus. Hier zeigten sich in einigen Fällen teils deutliche Differenzen zwischen qRT-PCR und ddPCR. Auffällig war hierbei, dass Abweichungen größerer Prozentfaktor 5 fast ausschließlich unter der Voraussetzung auftraten, dass sowohl die Resultate der relativen als auch der absoluten Quantifizierung außerhalb der linearen Bereiche der dynamischen Reichweite der Verfahren lagen. In der wissenschaftlichen Literatur wird im Rahmen der qRT-PCR ein Idealbereich bei CT-Werten von ca. 15 bis 30 angenommen [206]. Herstellerangaben der ddPCR sprechen von einem dynamischen Bereich von 0,05 bis 6000 Kopien/ μ l [18]. Diese Herstellerangabe sollte jedoch eher kritisch betrachtet werden. Bislang veröffentlichte Versuchsreihen indizieren einen Bereich der dynamischen Reichweite der ddPCR zwischen 25-

1500 Kopien/ μl mit einem Idealbereich von 100-1000 Kopien/ μl [203]. Auch bei den Versuchen innerhalb dieser Dissertation konnten vermehrt Unsicherheiten und höhere Streuungsmaße vermerkt werden, wenn die Ergebnisse unterhalb einer Grenze von 50 bzw. oberhalb einer Grenze von 2000 Kopien/ μl lagen. Die Herstellerangabe einer dynamischen Reichweite von 0,05-6000 Kopien/ μl weist also eher auf den möglichen Bereich der Detektion hin und ist nicht als derjenige Bereich anzusehen, innerhalb derer mit validen Ergebnissen gerechnet werden kann. Gleiches gilt auch für die Angaben der qRT-PCR. Die experimentell validierte dynamische Reichweite der qRT-PCR ist größer als die der ddPCR [206]. Innerhalb dieser Spannweite besteht eine negativ-exponentielle Korrelation zwischen den mittels qRT-PCR ermittelten CT-Werten und den für identische Proben gemessenen Kopienanzahlen pro μl . An Randbereichen oder bei Werten außerhalb dieser Grenzen sollte stets eine kritische Evaluierung der Ergebnisse erfolgen, um Verzerrungen durch Primer-Hybridisierungen, Dimer- und Schleifenbildungen sowie Auftreten unspezifischer Nebenamplifikate auszuschließen [15,16,207]. Zudem empfiehlt es sich bei beiden Verfahren initial Verdünnungsreihen durchzuführen, um Messwerte innerhalb der dynamischen Reichweiten der Analyseverfahren zu erzielen und somit valide und sichere Ergebnisse zu erhalten. Für die absolute Quantifizierung mittels ddPCR sollte hierfür eine Kopienanzahl von $> 100/\mu\text{l}$ und $< 1000/\mu\text{l}$ angestrebt werden. Auch ist es ratsam, mehrere technische Replikate mitzuführen, wobei die Erhöhung der Validität und Sicherheit einerseits und der ökonomische und zeitliche Mehraufwand andererseits sorgfältig abgewogen werden sollten. Im Hinblick auf die qRT-PCR muss zudem die Stabilität und Reliabilität der genutzten Referenzgene gewährleistet sein. In Meta-Analysen mehrerer Gewebetypen konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit einer Zytokinstimulation durch Botenstoffe wie TNF- α die Stabilität und Reliabilität von Referenzgenen wie ACTB, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder 18S deutlich beeinflusst sein kann [208–210]. In der Tat wurde in der vorliegenden Dissertation speziell bei Ansatz 1 eine Schwäche des genutzten Referenzgens 18S festgestellt, die durch Unterschiede in den gemessenen CT-Werten zwischen unstimulierten und stimulierten Proben um etwa 3 bis 3,5 gekennzeichnet waren. Dies schränkt die Aussagekraft der mittels qRT-PCR erzielten Daten deutlich ein. Möglicherweise sind hieraus auch erhöhte Abweichungen zwischen den Ergebnissen der beiden PCR-Verfahren bedingt.

Im Vergleich zur qRT-PCR bietet die ddPCR klare durch Studien belegte Vorteile: (1) keine Notwendigkeit von externer Kalibrierung mittels Standardkurven, (2) keine Notwendigkeit zur Nutzung von Referenzgenen und (3) eine deutlich höhere Resilienz gegenüber unspezifischen PCR-Inhibitoren und Hintergrund-DNA innerhalb des Versuchsansatzes, wodurch in vielen Fällen eine höhere Sensitivität und Spezifität erreicht werden kann. Klare Überlegenheit der

ddPCR gegenüber der qRT-PCR konnte in Bereichen gezeigt werden, bei denen die Detektion geringer Kopienanzahlen nötig war, um eine weiterführende Aussage treffen zu können, beispielsweise im Fall von viralen [211] oder kanzerösen Mutation [212] oder bei der Detektion von sogenannten Kopienzahlvarianten (engl. copy number variations, CNV) [203]. Demgegenüber steht allerdings ein erhöhter Kosten- und Arbeitsaufwand der ddPCR [213,214]. Die Durchführung der ddPCR ist auf das 96-Well-Format beschränkt, so dass der Probendurchsatz im Vergleich zur qRT-PCR deutlich reduziert ist. Zudem ist der benötigte Zeitaufwand pro Durchlauf durch zusätzlich erforderliche Arbeitsschritte erhöht. Auch die angesprochene Widerstandsfähigkeit gegen PCR-Inhibitoren [15] muss dahingehend eingeschränkt werden, dass das Ausmaß dieser Resilienz der ddPCR abhängig von Art und Menge der vorhandenen Inhibitoren innerhalb der Kompartimente ist [215]. Die Entscheidung für eines der beiden Analyseverfahren kann daher nicht pauschal getroffen werden. Vielmehr ist durch den Wissenschaftler vorab eine Abwägung der genannten Punkte vorzunehmen, um die für die geplanten Untersuchungen optimale Methode auszuwählen.

6 Zusammenfassung

Die ddPCR ist eine geeignete Methode zur absoluten Quantifizierung von Zielgensequenzen und könnte im Laufe der nächsten Jahre zunehmend an Bedeutung gewinnen. Sie bietet gegenüber der qRT-PCR den Vorteil der Unabhängigkeit von Referenzgenen und ist zudem dieser Methode bei einigen Versuchskonzepten und Fragestellungen in ihrer Reproduzierbarkeit voraus. Vor Anwendung der ddPCR sollte allerdings darauf geachtet werden die Versuchsbedingungen zu optimieren, u.a. durch die Anwendung von Verdünnungsreihen zur Ermittlung der optimalen Zielgenkonzentrationen innerhalb des Reaktionsansatzes. Auch sollte in Bezug auf ökonomische und zeitliche Faktoren eine strenge Indikationsstellung für diese Methodik getroffen werden.

Im Hinblick auf die innerhalb der Dissertation ermittelten Ergebnisse kann festgestellt werden, dass sich die Mehrheit der erzielten Daten mit der derzeitigen Studienlage in Einklang bringen lassen. Im inflammatorischen Milieu kommt es demnach zur (1) Suppression von vasokonstriktorisches Effekten, (2) Auflösung fester Zell-Zell-Kontakte zur Steigerung der Paravasation und (3) Verminderung der entzündungsfördernden Effekte des Angiotensin II innerhalb einer Inflammation von endotheliale Gewebe. Überdies bewirkt die Zytokinstimulation von Endothelzellen die vermehrte Expression (1) der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowie (2) von pro-inflammatorischen Botenstoffen und Chemokinen. Im Bereich der Gerinnungsfunktion zeigte sich das Bild einer fulminanten disseminierten intravasalen Koagulopathie (engl. disseminated intravascular coagulation, DIC). Mit Blick auf die untersuchten PUFA-Effekte unterstützen die erzielten Daten den Trend aktueller Studien zur Lockerung der Einteilung von ausschließlich pro- bzw. anti-inflammatorisch wirksamen PUFA. Zwar ließen sich zu erwartende Effekte bestätigen, die dem Muster der anti-inflammatorisch wirksamen Omega-3-Fettsäuren und der pro-inflammatorisch wirksamen Omega-6-Fettsäuren folgen. Allerdings konnten sowohl bei LNA als Vertreter der Omega-3-Familie als auch bei AA als Mitglied der Omega-6-Familie sowohl anti- als auch pro-inflammatorische Effekte festgestellt werden. Dies lässt die alte, starre Fassade der Einteilung der PUFA in „gut“ und „böse“ etwas bröckeln und zeigt, dass eine kritischere Betrachtung angebracht ist, die die Art des Zielgens und die Phase der inflammatorischen Reaktion mit einbezieht.

7 Literaturverzeichnis

1. Alonso A (2004) Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci Int* 139: 141-149.
2. Waggoner JJ, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Ballesteros G, Davila MJV, Tellez Y, Sahoo MK, Balmaseda A, Harris E, Pinsky BA (2016) Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *Emerg Infect Dis* 22: 1295-1297.
3. Dominguez SR, Pretty K, Hengartner R, Robinson CC, Loeffelholz MJ (2018) Comparison of Herpes Simplex Virus PCR with Culture for Virus Detection in Multisource Surface Swab Specimens from Neonates. *J Clin Microbiol* 56: e1.
4. Camunas-Soler J, Lee H, Hudgins L, Hintz SR, Blumenfeld YJ, El-Sayed YY, Quake SR (2018) Noninvasive Prenatal Diagnosis of Single-Gene Disorders by Use of Droplet Digital PCR. *Clin Chem* 64: 336-345.
5. Kiani BH, Suberu J, Mirza B (2016) Cellular engineering of *Artemisia annua* and *Artemisia dubia* with the rol ABC genes for enhanced production of potent anti-malarial drug artemisinin. *Malar J* 15: 1049.
6. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32 : e103.
7. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong Fong T, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA (2003) Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence. An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3: 18.
8. Pfaffl MW (2004) Real-time RT-PCR: new approaches for exact mRNA quantification. *Biospektrum*: 92-95.
9. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402-408.
10. Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström M-L (2004) Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 59: 566-573.
11. Zhong H, Simons JW (1999) Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 523-526.
12. Karakozova M, Kozak M, Wong CCL, Bailey AO, Yates JR, Mogilner A, Zebroski H, Kashina A (2006) Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science* 313: 192-196.
13. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW (2011) High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83: 8604-8610.

14. 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. *Nat Methods* 10: 1003-1005.
15. Rački N, Dreo T, Gutierrez-Aguirre I, Blejec A, Ravnikar M (2014) Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant methods* 10: 42.
16. Taylor SC, Carbonneau J, Shelton DN, Boivin G (2015) Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR. Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *J Virol Methods* 224: 58-66.
17. Strain MC, Lada SM, Luong T, Rought SE, Gianella S, Terry VH, Spina CA, Woelk CH, Richman DD (2013) Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PLoS one* 8: e55943.
18. Bio-Rad Laboratories (2017) Technical manual: Droplet Digital PCR. Applications Guide.
19. Wolinsky H (1980) A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. *Circ Res* 47: 301-311.
20. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, Egbrink MGA (2007) The endothelial glycocalyx. Composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 454: 345-359.
21. Hasdai D, Gibbons RJ, Holmes DR, Higano ST, Lerman A (1997) Coronary Endothelial Dysfunction in Humans Is Associated With Myocardial Perfusion Defects. *Circulation* 96: 3390-3395.
22. Bautista LE (2003) Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure. Epidemiologic and biological evidence. *J Hum Hypertens* 17: 223-230.
23. Iiyama K, Nagano M, Yo Y, Nagano N, Kamide K, Higaki J, Mikami H, Ogihara T (1996) Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography. *Am Heart J* 132: 779-782.
24. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE (1990) Abnormal Endothelium-Dependent Vascular Relaxation in Patients with Essential Hypertension. *N Engl J Med* 323: 22-27.
25. Dumnicka P, Maduzia D, Ceranowicz P, Olszanecki R, Drożdż R, Kuśnierz-Cabala B (2017) The Interplay between Inflammation, Coagulation and Endothelial Injury in the Early Phase of Acute Pancreatitis. Clinical Implications. *Int J Mol Sci* 18: 354.
26. Venetsanakos E, Mirza A, Fanton C, Romanov SR, Tlsty T, McMahon M (2002) Induction of Tubulogenesis in Telomerase-Immortalized Human Microvascular Endothelial Cells by Glioblastoma Cells. *Ex Cell Res* 273: 21-33.
27. Ruster C, Wolf G (2006) Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Progression of Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 2985-2991.
28. Ferrario CM, Strawn WB (2006) Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Proinflammatory Mediators in Cardiovascular Disease. *Am J Cardiol* 98: 121-128.
29. Estado V, Obadia N, Carvalho-Tavares J, Freitas FS, Reis P, Neto HCF, Lessa MA, Tibiriçá E (2013) Blockade of the renin-angiotensin system improves cerebral microcirculatory perfusion in diabetic hypertensive rats. *Microvasc Res* 87: 41-49.
30. Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K (2014) The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. *Int J Inflamm* 2014: 1-13.

31. Gimbrone M, Alexander R (1975) Angiotensin II stimulation of prostaglandin production in cultured human vascular endothelium. *Science* 189: 219-220.
32. Li Y, Yan Z, Chaudhry K, Kazlauskas A (2020) The Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) Is One of the Effectors by Which Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/Anti-VEGF Controls the Endothelial Cell Barrier. *Am J Pathol* 190: 1971-1981.
33. Liang B, Wang X, Zhang N, Yang H, Bai R, Liu M, Bian Y, Xiao C, Yang Z (2015) Angiotensin-(1-7) Attenuates Angiotensin II-Induced ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 Expression via the MAS Receptor Through Suppression of P38 and NF- κ B Pathways in HUVECs. *Cell Physiol Biochem* 35: 2472-2482.
34. Han Y, Runge MS, Brasier AR (1999) Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res* 84: 695-703.
35. Skurk T, van Harmelen V, Hauner H (2004) Angiotensin II Stimulates the Release of Interleukin-6 and Interleukin-8 From Cultured Human Adipocytes by Activation of NF- κ B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1199-1203.
36. Coates D (2003) The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol* 35: 769-773.
37. Matsuda H, Hayashi K, Wakino S, Kubota E, Honda M, Tokuyama H, Takamatsu I, Tatematsu S, Saruta T (2004) Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in ACE inhibitor-induced renal vasodilation in vivo. *Hypertension* 43: 603-609.
38. Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, Alleaume AM, Di Benedetto M, Boden C, Masson M, Strosberg AD, Horiuchi M, Couraud PO, Nahmias C (2004) Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem* 279: 28989-28997.
39. Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserow H, Menk M, Scheffe JH, Kruse ML, Stoll M, Unger T (2005) Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 57-64.
40. Tamura K, Tanaka Y, Tsurumi Y, Azuma K, Shigenaga AI, Wakui H, Masuda SI, Matsuda M (2007) The role of angiotensin AT1 receptor-associated protein in renin-angiotensin system regulation and function. *Curr Hypertens Rep* 9: 121-127.
41. Lopez-Illasaca M, Liu X, Tamura K, Dzau VJ (2003) The angiotensin II type I receptor-associated protein, ATRAP, is a transmembrane protein and a modulator of angiotensin II signaling. *Mol Biol Cell* 14: 5038-5050.
42. Cui T, Nakagami H, Iwai M, Takeda Y, Shiuchi T, Tamura K, Daviet L, Horiuchi M (2000) ATRAP, novel AT1 receptor associated protein, enhances internalization of AT1 receptor and inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Biochem Bioph Res Co* 279: 938-941.
43. Grisanti LA, Perez DM, Porter JE (2011) Modulation of immune cell function by α (1)-adrenergic receptor activation. *Curr Top Membr* 67: 113-138.
44. Bucher M, Kees F, Taeger K, Kurtz A (2003) Cytokines down-regulate alpha1-adrenergic receptor expression during endotoxemia. *Crit Care Med* 31: 566-571.
45. Ghosh S, Liu MS (1983) Changes in alpha-adrenergic receptors in dog livers during endotoxic shock. *J Surg Res* 34: 239-245.
46. Hwang TL, Lau YT, Huang SF, Chen MF, Liu MS (1994) Changes of alpha 1-adrenergic receptors in human liver during intraabdominal sepsis. *Hepatology* 20: 638-642.

47. Forse RA, Saint-Vil D, Gagner M, Borlase BC (1992) Intra-abdominal sepsis and adrenergic receptor response. *J Trauma* 32: 564-569.
48. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES (2000) The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems. *The brain and the immune system. Pharmacol Rev* 52: 595-638.
49. Nakamura A, Johns EJ, Imaizumi A, Yanagawa Y, Kohsaka T (2000) beta(2)-adrenoceptor agonist suppresses renal tumour necrosis factor and enhances interleukin-6 gene expression induced by endotoxin. *Nephrol Dial Transplant* 15: 1928-1934.
50. Li CY, Chou TC, Lee CH Tsai CS, Loh SH, Wong CS (2003) Adrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes. The role of beta-adrenergic receptors. *Anesth Analg* 96: 518-23.
51. Freeman BD, Machado FS, Tanowitz HB, Desruisseaux MS (2014) Endothelin-1 and its role in the pathogenesis of infectious diseases. *Life Sci* 118: 110-119.
52. Bucher M, Taeger K (2002) Endothelin-receptor gene-expression in rat endotoxemia. *Intensive Care Med* 28: 642-647.
53. Goto T, Hussein MH, Kato S, Daoud GAH, Kato T, Kakita H, Mizuno H, Imai M, Ito T, Kato I, Suzuki S, Okada N, Togari H, Okada H (2010) Endothelin receptor antagonist attenuates inflammatory response and prolongs the survival time in a neonatal sepsis model. *Intensive Care Med* 36: 2132-2139.
54. Boron WF, Boulpaep EL (2009) *Medical physiology. A cellular and molecular approach.* Saunders/Elsevier: 1337.
55. Frank PG, Lisanti MP (2008) ICAM-1. Role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H926-H927.
56. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Lusinskas FW (2005) ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106: 584-592.
57. Kong D-H, Kim YK, Kim MR, Jang JH, Lee S (2018) Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci* 19.
58. Etienne-Manneville S, Chaverot N, Strosberg AD, Couraud PO (1999) ICAM-1-coupled signaling pathways in astrocytes converge to cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and TNF-alpha secretion. *J Immunol* 163: 668-674.
59. Cesari M, Pahor M, Incalzi RA (2010) Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). A key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther* 28: 72-91.
60. Johansson PI, Haase N, Perner A, Ostrowski SR (2014) Association between sympathoadrenal activation, fibrinolysis, and endothelial damage in septic patients. A prospective study. *J Crit Care* 29: 327-333.
61. Shahidi M (2017) Thrombosis and von Willebrand Factor. *Adv Exp Med Biol* 906: 285-306.
62. Sadler JE (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 67: 395-424.
63. Konigsberg W, Kirchhofer D, Riederer M, Nemerson Y (2017) The TF. VIIa Complex: Clinical Significance, Structure-function Relationships and Its Role in Signaling and Metastasis. *J Thromb Haemost* 86: 757-771.

64. Ruf W, Disse J, Carneiro-Lobo TC, Yokota N, Schaffner F (2011) Tissue factor and cell signalling in cancer progression and thrombosis. *J Thromb Haemost* 9: 306-315.
65. Vadeboncoeur N, Segura M, Al-Numani D, Vanier G, Gottschalk M (2003) Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35: 49-58.
66. Rochfort KD, Cummins PM (2015) The blood-brain barrier endothelium. A target for pro-inflammatory cytokines. *Biochem Soc Trans* 43: 702-706.
67. Danese S, Dejana E, Fiocchi C (2007) Immune regulation by microvascular endothelial cells. Directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol* 178: 6017-6022.
68. Dinarello CA (2015) The history of fever, leukocytic pyrogen and interleukin-1. *Temperature* 2: 8-16.
69. Du L, Dong F, Guo L, Hou Y, Yi F, Liu J, Xu D (2015) Interleukin-1 β increases permeability and upregulates the expression of vascular endothelial-cadherin in human renal glomerular endothelial cells. *Mol Med Rep* 11: 3708-3714.
70. Puhlmann M, Weinreich DM, Farma JM, Carroll NM, Turner EM, Alexander HR (2005) Interleukin-1 β induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial tissue factor (TF) activity. *J Transl Med* 3: 37.
71. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6 : a016295.
72. Watson C, Whittaker S, Smith N, Vora AJ, Dumonde DC, Brown KA (1996) IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 105: 112-119.
73. Krüttgen A, Rose-John S (2012) Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome. *J Interferon Cytokine Res* 32: 60-65.
74. Cartmell T, Poole S, Turnbull AV, Rothwell NJ, Luheshi GN (2000) Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *J Physiol* 526: 653-661.
75. Lebherz C, Kahles F, Piotrowski K, Vogeser M, Foldenauer AC, Nassau K, Kilger E, Marx N, Parhofer KG, Lehrke M (2016) Interleukin-6 predicts inflammation-induced increase of Glucagon-like peptide-1 in humans in response to cardiac surgery with association to parameters of glucose metabolism. *Cardiovasc Diabetol* 15: 21.
76. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S-i, Tsukamoto H, Shimoda T (2010) Transmembrane TNF- α . Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 49: 1215-1228.
77. Lou J, Dayer JM, Grau GE, Burger D (1996) Direct cell/cell contact with stimulated T lymphocytes induces the expression of cell adhesion molecules and cytokines by human brain microvascular endothelial cells. *Eur J Immunol* 26: 3107-3113.
78. Parameswaran N, Patial S (2010) Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20: 87-103.
79. Maggi E, Almerigogna F, Del Prete G, Romagnani S (1993) Abnormal B cell helper activity by virus-infected human CD4 $^{+}$ T cells. *Semin Immunol* 5: 449-455.

80. Macchia D, Almerigogna F, Parronchi P, Ravina A, Maggi E, Romagnani S (1993) Membrane tumour necrosis factor-alpha is involved in the polyclonal B-cell activation induced by HIV-infected human T cells. *Nature* 363: 464-466.
81. Stefferl A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Luheshi GN (1996) The role of TNF-alpha in fever. Opposing actions of human and murine TNF-alpha and interactions with IL-beta in the rat. *Br J Pharmacol* 118: 1919-1924.
82. McHale JF, Harari OA, Marshall D, Haskard DO (1999) TNF-alpha and IL-1 sequentially induce endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression in MRL/lpr lupus-prone mice. *J Immunol* 163: 3993-4000.
83. Al-Sadi R, Guo S, Ye D, Ma TY (2013) TNF- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier is regulated by ERK1/2 activation of Elk-1. *Am J Pathol* 183: 1871-1884.
84. Imaizumi T, Itaya H, Fujita K, Kudoh D, Kudoh S, Mori K, Fujimoto K, Matsumiya T, Yoshida H, Satoh K (2000) Expression of tumor necrosis factor-alpha in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or interleukin-1alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 410-415.
85. Root RK, Dale DC (1999) Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Comparisons and potential for use in the treatment of infections in nonneutropenic patients. *J Infect Dis* 179: S342-52.
86. Cousins DJ, Staynov DZ, Lee TH (1994) Regulation of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression. *Am J Respir Crit Care Med* 150: S50-3.
87. Nimer SD, Uchida H (1995) Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 expression. *Stem Cells* 13: 324-335.
88. Nagata M, Sedgwick JB, Kita H, Busse WW (1998) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor augments ICAM-1 and VCAM-1 activation of eosinophil function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 158-166.
89. Fleischmann J, Golde DW, Weisbart RH, Gasson JC (1986) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* 68: 708-711.
90. Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M (2003) Chemokines. Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol* 111: 1185-99.
91. Vilgelm AE, Richmond A (2019) Chemokines Modulate Immune Surveillance in Tumorigenesis, Metastasis, and Response to Immunotherapy. *Front Immunol* 10: 333.
92. Arango Duque G, Descoteaux A (2014) Macrophage cytokines. Involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 5: 491.
93. Hedges JC, Singer CA, Gerthoffer WT (2000) Mitogen-activated protein kinases regulate cytokine gene expression in human airway myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 86-94.
94. Wolff B, Burns AR, Middleton J, Rot A (1998) Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation. Human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies. *Journal Exp Med* 188: 1757-1762.
95. Utgaard JO, Jahnsen FL, Bakka A, Brandtzaeg P, Haraldsen G (1998) Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med* 188: 1751-1756.

96. Brat DJ, Bellail AC, van Meir EG (2005) The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* 7: 122-133.
97. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK (2003) IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 170: 3369-3376.
98. Colotta F, Sciacca FL, Sironi M, Luini W, Rabiet MJ, Mantovani A (1994) Expression of monocyte chemoattractant protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol* 144: 975-985.
99. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). An overview. *J Interferon Cytokine Res* 29: 313-326.
100. Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Sanghi PS, Lincoln P, Kunkel SL (1996) Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation. Relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J Immunol* 157: 4602-4608.
101. Kim MS, Day CJ, Morrison NA (2005) MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. *J Biol Chem* 280: 16163-16169.
102. Raphael W, Sordillo LM (2013) Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation. The role of phospholipid biosynthesis. *Int J Mol Sci* 14: 21167-21188.
103. Wang L, Lim E-J, Toborek M, Hennig B (2008) The role of fatty acids and caveolin-1 in tumor necrosis factor alpha-induced endothelial cell activation. *Metab: Clin Exp* 57: 1328-1339.
104. Abbott SK, Else PL, Atkins TA, Hulbert AJ (2012) Fatty acid composition of membrane bilayers. Importance of diet polyunsaturated fat balance. *BBA-Mol Cell Res* 1818: 1309-1317.
105. Corsetto PA, Cremona A, Montorfano G, Jovenitti IE, Orsini F, Arosio P, Rizzo AM (2012) Chemical-physical changes in cell membrane microdomains of breast cancer cells after omega-3 PUFA incorporation. *Cell Biochem Biophys* 64: 45-59.
106. Abbott SK, Else PL, Hulbert AJ (2010) Membrane fatty acid composition of rat skeletal muscle is most responsive to the balance of dietary n-3 and n-6 PUFA. *Brit J Nutr* 103: 522-529.
107. Fukaya T, Gondaira T, Kashiya Y, Kotani S, Ishikura Y, Fujikawa S, Kiso Y, Sakakibara M (2007) Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats. *Neurobiol Aging* 28: 1179-1186.
108. Turk HF, Chapkin RS (2013) Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 88: 43-47.
109. Schley PD, Brindley DN, Field CJ (2007) (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J Nutr* 137: 548-553.
110. Feng C, Keisler DH, Fritsche KL (1999) Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce IFN-gamma receptor expression in mice. *J Interferon Cytokine Res* 19: 41-48.
111. He G-Z, Zhou K-G, Zhang R, Chen X-F (2012) The effects of n-3 PUFA and intestinal lymph drainage on high-mobility group box 1 and Toll-like receptor 4 mRNA in rats with intestinal ischaemia-reperfusion injury. *Brit J Nutr* 108: 883-892.

112. Mayatepek E, Paul K, Leichsenring M, Pfisterer M, Wagner D, Domann M, Sonntag HG, Bremer HJ (1994) Influence of dietary (n-3)-polyunsaturated fatty acids on leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ synthesis and course of experimental tuberculosis in guinea pigs. *Infection* 22: 106-112.
113. Noguchi M, Earashi M, Minami M, Kinoshita K, Miyazaki I (1995) Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on cell growth and prostaglandin E and leukotriene B production by a human breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Oncology* 52: 458-464.
114. Ruxton CHS, Calder PC, Reed SC, Simpson MJA (2005) The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. *Nutr Res Rev* 18: 113-129.
115. Fan Y-Y, Davidson LA, Callaway ES, Goldsby JS, Chapkin RS (2014) Differential effects of 2- and 3-series E-prostaglandins on in vitro expansion of Lgr5⁺ colonic stem cells. *Carcinogenesis* 35: 606-612.
116. Yang P, Chan D, Felix E, Cartwright C, Menter DG, Madden T, Klein RD, Fischer SM, Newman RA (2004) Formation and antiproliferative effect of prostaglandin E₃ from eicosapentaenoic acid in human lung cancer cells. *J Lipid Res* 45: 1030-1039.
117. Hu Y, Hu FB, Manson JE (2019) Marine Omega-3 Supplementation and Cardiovascular Disease. An Updated Meta-Analysis of 13 Randomized Controlled Trials Involving 127 477 Participants. *J Am Heart Assoc* 8: e013543.
118. Abdelhamid AS, Brown TJ, Brainard JS, Biswas P, Thorpe GC, Moore HJ, Deane KH, Al Abdulghafoor FK, Summerbell CD, Worthington HV, Song F, Hooper L (2018) Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 7: CD003177.
119. Schacky C von, Harris WS (2007) Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Cardiovasc Res* 73: 310-315.
120. Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS, Espat NJ (2003) NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L84-9.
121. Solanki P, Aminoshariae A, Jin G, Montagnese TA, Mickel A (2013) The effect of docosahexaenoic acid (DHA) on expression of IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α in normal and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages. *Quintessence Int* 44: 393.
122. Adolph S, Schoeniger A, Fuhrmann H, Schumann J (2012) Unsaturated fatty acids as modulators of macrophage respiratory burst in the immune response against *Rhodococcus equi* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Free Radic Biol Med* 52: 2246-2253.
123. Schoeniger A, Adolph S, Fuhrmann H, Schumann J (2011) The impact of membrane lipid composition on macrophage activation in the immune defense against *Rhodococcus equi* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* 12: 7510-7528.
124. Collie-Duguid ES, Wahle KW (1996) Inhibitory effect of fish oil N-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 969-974.
125. Wang TM, Chen CJ, Lee TS, Chao HY, Wu WH, Hsieh SC, Sheu HH, Chiang AN (2011) Docosahexaenoic acid attenuates VCAM-1 expression and NF- κ B activation in TNF- α -treated human aortic endothelial cells. *J Nutr Biochem* 22: 187-194.
126. Trommer S, Leimert A, Bucher M, Schumann J (2017) Impact of Unsaturated Fatty Acids on Cytokine-Driven Endothelial Cell Dysfunction. *Int J Mol Sci* 18.

127. Bray MA, Cunningham FM, Ford-Hutchinson AW, Smith MJ (1981) Leukotriene B4. A mediator of vascular permeability. *Brit J Pharmacol* 72: 483-486.
128. Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U (2004) GlyR alpha3. An essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304: 884-887.
129. Kawabata A (2011) Prostaglandin E2 and pain--an update. *Biol Pharm Bull* 34: 1170-1173.
130. Lazarus M, Yoshida K, Coppari R, Bass CE, Mochizuki T, Lowell BB, Saper CB (2007) EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat Neurosci* 10: 1131-1133.
131. Blatteis CM, Li S, Li Z, Feleder C, Perlik V (2005) Cytokines, PGE2 and endotoxic fever. A re-assessment. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 76: 1-18.
132. Robert A, Schultz JR, Nezamis JE, Lancaster C (1976) Gastric Antisecretory and Antiulcer Properties of PGE2, 15-Methyl PGE2, and 16,16-Dimethyl PGE2. *Gastroenterology* 70: 359-370.
133. Rincón-Sánchez AR, Covarrubias A, Rivas-Estilla AM, Pedraza-Chaverrí J, Cruz C, Islas-Carbajal MC, Panduro A, Estanes A, Armendáriz-Borunda J (2005) PGE2 alleviates kidney and liver damage, decreases plasma renin activity and acute phase response in cirrhotic rats with acute liver damage. *Exp Toxicol Pathol* 56: 291-303.
134. Ozen G, Benyahia C, Mani S, Boukais K, Silverstein AM, Bayles R, Nelsen AC, Castier Y, Danel C, Mal H, Clapp LH, Longrois D, Norel X (2020) Bronchodilation induced by PGE2 is impaired in Group III pulmonary hypertension. *Brit J Pharmacol* 177: 161-174.
135. Simopoulos AP (2016) An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients* 8: 128.
136. DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH (2018) Importance of maintaining a low omega-6/omega-3 ratio for reducing inflammation. *Open Heart* 5: e000946.
137. Huerta-Yépez S, Tirado-Rodriguez AB, Hankinson O (2016) Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer. *Bol Med Hosp Infant Mex* 73: 446-456.
138. Huang Q, Wen J, Chen G, Ge M, Gao Y, Ye X, Liu C, Cai C (2016) Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibited Tumor Growth via Preventing the Decrease of Genomic DNA Methylation in Colorectal Cancer Rats. *Nutr Cancer* 68: 113-119.
139. Chen H, Wang S, Zhao Y, Luo Y, Tong H, Su L (2018) Correlation analysis of omega-3 fatty acids and mortality of sepsis and sepsis-induced ARDS in adults. Data from previous randomized controlled trials. *Nutr J* 17: 57.
140. Coras R, Pedersen B, Narasimhan R, Brandy A, Mateo L, Prior A, Kavanaugh A, Armando AM, Jain M, Quehenberger O, Martinez M, Guma M (2020) Imbalance Between Omega-6 and Omega-3 Derived Bioactive Lipids in Arthritis in the Elderly. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci, Series A*.
141. Huang ZH, Bates EJ, Ferrante JV, Hii CS, Poulos A, Robinson BS, Ferrante A (1997) Inhibition of stimulus-induced endothelial cell intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cellular adhesion molecule-1 expression by arachidonic acid and its hydroxy and hydroperoxy derivatives. *Circ Res* 80: 149-158.
142. Adolph S, Fuhrmann H, Schumann J (2012) Unsaturated fatty acids promote the phagocytosis of *P. aeruginosa* and *R. equi* by RAW264.7 macrophages. *Curr Microbiol* 65: 649-655.

143. Calder PC (2007) Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77: 327-335.
144. Schumann J, Leichtle A, Thiery J, Fuhrmann H (2011) Fatty acid and peptide profiles in plasma membrane and membrane rafts of PUFA supplemented RAW264.7 macrophages. *PLoS one* 6: e24066.
145. Schoeniger A, Fuhrmann H, Schumann J (2016) LPS- or *Pseudomonas aeruginosa*-mediated activation of the macrophage TLR4 signaling cascade depends on membrane lipid composition. *PeerJ* 4: e1663.
146. Hellwing C, Tigistu-Sahle F, Fuhrmann H, Käkelä R, Schumann J (2018) Lipid composition of membrane microdomains isolated detergent-free from PUFA supplemented RAW264.7 macrophages. *J Cell Physiol* 233: 2602-2612.
147. Promega Corporation (2016) Technical manual: RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay. Instructions for Use of Products G9711, G9712 and G9713.
148. STRATEC Molecular (2017) Technical manual: InviTrap Spin Universal RNA Mini Kit.
149. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST. A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.
150. van Kasteren PB, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Jonge J, van den Brandt A, Molenkamp R, Reusken CBEM, Meijer A (2020) Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol* 128: 104412.
151. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines. Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611-622.
152. O'Reilly T, Ostergaard C, Vaxelaire J, Zak O (2007) Systemic inflammation alters the inflammatory response in experimental lipopolysaccharide-induced meningitis. *Clin Exp Immunol* 147: 112-119.
153. Montasser IF, El-Gindy EM, Al-Lam EH, Elbaz HS, Khalifa RAA, Ali HES (2015) Value of cerebrospinal fluid tumor necrosis factor-alpha (TN-alpha) for rapid diagnosis of bacterial meningitis. *J Egypt Soc Parasitol* 45: 655-662.
154. Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P (1989) Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med* 17: 975-978.
155. Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer JM (1992) High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 145: 1016-1022.
156. Mayer K, Schmidt R, Muhly-Reinholz M, Bögeholz T, Gokorsch S, Grimminger F, Seeger W (2002) In vitro mimicry of essential fatty acid deficiency in human endothelial cells by TNFalpha impact of omega-3 versus omega-6 fatty acids. *J Lipid Res* 43: 944-951.
157. Leaf DA, Connor WE, Barstad L, Sexton G (1995) Incorporation of dietary n-3 fatty acids into the fatty acids of human adipose tissue and plasma lipid classes. *Am J Clin Nutr* 62: 68-73.

158. Reddy DS, Bhatnagar-Mathur P, Cindhuri KS, Sharma KK (2013) Evaluation and validation of reference genes for normalization of quantitative real-time PCR based gene expression studies in peanut. *PloS one* 8: e78555.
159. Borowski JM, Galli V, Messias R, Perin EC, Buss JH, Sérgio D, Rombaldi CV (2014) Selection of candidate reference genes for real-time PCR studies in lettuce under abiotic stresses. *Planta* 239: 1187-1200.
160. Myerski A, Siegel A, Engstrom J, McGowan I, Brand RM (2019) The Use of Droplet Digital PCR to Quantify HIV-1 Replication in the Colorectal Explant Model. *AIDS Res Hum Retrovir* 35: 326-334.
161. Wang Q, Cai Y, He Y, Yang L, Li J, Pan L (2018) Droplet digital PCR (ddPCR) method for the detection and quantification of goat and sheep derivatives in commercial meat products. *Eur Food Res Technol* 244: 767-774.
162. Cai Y, Li X, Lv R, Yang J, Li J, He Y, Pan L (2014) Quantitative analysis of pork and chicken products by droplet digital PCR. *Biomed Res Int* 2014: 810209.
163. Wang SY, Stamler A, Li J, Johnson RG, Sellke FW (1997) Decreased myogenic reactivity in skeletal muscle arterioles after hypothermic cardiopulmonary bypass. *J Surg Res* 69: 40-44.
164. Hwang T-L, Lau Y-T, Huang S-F, Chen M-F, Liu M-S (1994) Changes of α 1-adrenergic receptors in human liver during intraabdominal sepsis. *Hepatology* 20: 638-642.
165. McMillan M, Chernow B, Roth BL (1986) Hepatic alpha 1-adrenergic receptor alteration in a rat model of chronic sepsis. *Circ Shock* 19 (2): 185-193.
166. Lush CW, Kvietys PR (2000) Microvascular dysfunction in sepsis. *Microcirculation* 7: 83-101.
167. Marino F, Cosentino M (2013) Adrenergic modulation of immune cells. An update. *Amino Acids* 45: 55-71.
168. Lorton D, Bellinger DL (2015) Molecular mechanisms underlying β -adrenergic receptor-mediated cross-talk between sympathetic neurons and immune cells. *Int J Mol Sci* 16: 5635-5665.
169. Grethe S, Ares MPS, Andersson T, Pörn-Ares MI (2004) p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L). *Exp Cell Res* 298: 632-642.
170. Ancion A, Tridetti J, Nguyen Trung M-L, Oury C, Lancellotti P (2019) A Review of the Role of Bradykinin and Nitric Oxide in the Cardioprotective Action of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Focus on Perindopril. Cardiol Ther* 8: 179-191.
171. Guo S, Som AT, Arai K, Lo EH (2019) Effects of angiotensin-II on brain endothelial cell permeability via PPARalpha regulation of para- and trans-cellular pathways. *Brain Res* 1722: 146353.
172. Wang Y, Dai X, Liu Y, Li J, Liu Z, Yin P, Chen J, Wang Y, Wang N, Zhang P (2016) MTUS1 silencing promotes E-selectin production through p38 MAPK-dependent CREB ubiquitination in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 101: 1-10.
173. Jing F, Mogi M, Min LJ, Ohshima K, Nakaoka H, Tsukuda K, Wang X, Iwanami J, Horiuchi M (2013) Effect of angiotensin II type 2 receptor-interacting protein on adipose tissue function via modulation of macrophage polarization. *PloS one* 8: e60067.

174. Fujita T, Mogi M, Min LJ, Iwanami J, Tsukuda K, Sakata A, Okayama H, Iwai M, Nahmias C, Higaki J, Horiuchi M (2009) Attenuation of cuff-induced neointimal formation by overexpression of angiotensin II type 2 receptor-interacting protein 1. *Hypertension* 53: 688-693.
175. Haruhara K, Wakui H, Azushima K, Kurotaki D, Kawase W, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Ohki K, Kinguchi S, Ohsawa M, Minegishi S, Ishigami T, Matsuda M, Yamashita A, Nakajima H, Tamura T, Tsuboi N, Yokoo T, Tamura K(2018) Angiotensin receptor-binding molecule in leukocytes in association with the systemic and leukocyte inflammatory profile. *Atherosclerosis* 269: 236-244.
176. Maeda A, Tamura K, Wakui H, Dejima T, Ohsawa M, Azushima K, Kanaoka T, Uneda K, Matsuda M, Yamashita A, Miyazaki N, Yatsu K, Hirawa N, Toya Y, Umemura S (2013) Angiotensin receptor-binding protein ATRAP/Agtrap inhibits metabolic dysfunction with visceral obesity. *J Am Heart Assoc* 2: e000312.
177. Elisa T, Antonio P, Giuseppe P, Alessandro B, Giuseppe A, Federico C, Marzia D, Ruggero B, Giacomo M, Andrea O, Daniela R, Mariaelisa R, Claudio L (2015) Endothelin Receptors Expressed by Immune Cells Are Involved in Modulation of Inflammation and in Fibrosis. Relevance to the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *J Immunol Res* 2015: 147616.
178. Birukova AA, Zagranichnaya T, Fu P, Alekseeva E, Chen W, Jacobson JR, Birukov KG (2007) Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. *Exp Cell Res* 313: 2504-2520.
179. Rodrigues HG, Vinolo MAR, Magdalon J, Vitzel K, Nachbar RT, Pessoa AFM, Dos Santos MF, Hatanaka E, Calder PC, Curi R (2012) Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. *J Invest Dermatol* 132: 208-215.
180. Mullen A, Loscher CE, Roche HM (2010) Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. *J Nutr Biochem* 21: 444-450.
181. Camuesco D, Comalada M, Concha A, Nieto A, Sierra S, Xaus J, Zarzuelo A, Gálvez J (2006) Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clin Nutr* 25: 466-476.
182. Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartali B, Corsi A, Lauretani F, Martin A, Andres-Lacueva C, Senin U, Guralnik JM (2006) Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 439-446.
183. Augimeri G, Plastina P, Gionfriddo G, Rovito D, Giordano C, Fazio A, Barone I, Catalano S, Andò S, Bonofiglio D, Meijerink J, Witkamp R (2019) N-Eicosapentaenoyl Dopamine, A Conjugate of Dopamine and Eicosapentaenoic Acid (EPA), Exerts Anti-inflammatory Properties in Mouse and Human Macrophages. *Nutrients* 11.
184. Zeerleder S, Schroeder V, Hack CE, Kohler HP, Willemin WA (2006) TAFI and PAI-1 levels in human sepsis. *Thromb Res* 118: 205-212.
185. Lorente L, Martín MM, Borreguero-León JM. Solé-Violán J, Ferreres J, Labarta L, Díaz C, Jiménez A, Páramo JA (2014) Sustained high plasma plasminogen activator inhibitor-1 levels are associated with severity and mortality in septic patients. *Thromb Res* 134: 182-186.
186. Cadroy Y, Dupouy D, Boneu B (1998) Arachidonic acid enhances the tissue factor expression of mononuclear cells by the cyclo-oxygenase-1 pathway. Beneficial effect of n-3 fatty acids. *J Immunol* 160: 6145-6150.

187. Tremoli E, Eligini S, Colli S, Maderna P, Risè P, Pazzucconi F, Marangoni F, Sirtori CR, Galli C (1994) n-3 fatty acid ethyl ester administration to healthy subjects and to hypertriglyceridemic patients reduces tissue factor activity in adherent monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 14: 1600-1608.
188. Goyens PLL, Mensink RP (2006) Effects of alpha-linolenic acid versus those of EPA/DHA on cardiovascular risk markers in healthy elderly subjects. *Eur J Clin Nutr* 60: 978-984.
189. Machado JR, Soave DF, Da Silva MV, Menezes LB, Etchebehere RM, Monteiro MLG, Dos Reis MA, Corrêa RRM, Celes MRN (2014) Neonatal sepsis and inflammatory mediators. *Mediators Inflamm* 2014: 269681.
190. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, Amdur RL, Zhao H, Dinarello CA, Cron RQ, Opal SM (2016) Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated With Reduced Mortality in Sepsis Patients With Features of Macrophage Activation Syndrome. Reanalysis of a Prior Phase III Trial. *Crit Care Med* 44: 275-281.
191. Feng M, Sun T, Zhao Y, Zhang H (2016) Detection of Serum Interleukin-6/10/18 Levels in Sepsis and Its Clinical Significance. *J Clin Lab Anal* 30: 1037-1043.
192. Jekarl DW, Lee SY, Lee J, Park YJ, Kim Y, Park JH, Wee JH, Choi SP (2013) Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75: 342-347.
193. Naffaa M, Makhoul BF, Tobia A, Kaplan M, Aronson D, Saliba W, Azzam ZS (2013) Interleukin-6 at discharge predicts all-cause mortality in patients with sepsis. *Am J Emerg Med* 31: 1361-1364.
194. Kumar S, Rizvi M (2010) Serum tumor necrosis factor alpha and C-reactive protein in pediatric patients with sepsis and its correlation with microbiologic findings. *Indian J Pathol Microbiol* 53: 494-497.
195. Schrag B, Roux-Lombard P, Schneiter D, Vaucher P, Mangin P, Palmiere C (2012) Evaluation of C-reactive protein, procalcitonin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 as diagnostic parameters in sepsis-related fatalities. *Int J Legal Med* 126: 505-512.
196. Prisco D, Paniccia R, Filippini M, Francalanci I, Bandinelli B, Comeglio P, Rostagno C, Abbate R, Gastone G, Sernerri N (1994) No changes in PAI-1 levels after four-month n-3 PUFA ethyl ester supplementation in healthy subjects. *Thromb Res* 76: 237-244.
197. Kew S, Mesa MD, Tricon S, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P (2004) Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 79: 674-681.
198. Sijben JWC, Calder PC (2007) Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. *Proc Nutr Soc* 66: 237-259.
199. Khalfoun B, Thibault F, Watier H, Bardos P, Lebranchu Y (1997) Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Med Biol* 400B: 589-597.
200. Ibrahim A, Mbodji K, Hassan A, Aziz M, Boukhattala N, Coëffier M, Savoye G, Déchelotte P, Marion-Letellier R (2011) Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium. *Clin Nutr* 30: 678-687.

201. Nauroth JM, Liu YC, Van Elswyk M, Bell R, Hall EB, Chung G, Arterburn LM (2010) Docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA_n-6) algal oils reduce inflammatory mediators in human peripheral mononuclear cells in vitro and paw edema in vivo. *Lipids* 45: 375-384.
202. Li H, Ruan XZ, Powis SH, Fernando R, Mon WY, Wheeler DC, Moorhead JF, Varghese Z (2005) EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells. Evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism. *Kidney Int* 67: 867-874.
203. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR (2012) Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. *Anal Chem* 84: 1003-1011.
204. Stuhlmeier KM, Tarn C, Csizmadia V, Bach FH (1996) Selective suppression of endothelial cell activation by arachidonic acid. *Eur J Immunol* 26: 1417-1423.
205. Diaz Encarnacion MM, Warner GM, Cheng J, Gray CE, Nath KA, Grande JP (2011) n-3 Fatty acids block TNF- α -stimulated MCP-1 expression in rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F1142-51.
206. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis. Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *J Biotechnol* 11: 1026-1030.
207. Bamias G, Goukos D, Laoudi E, Balla IG, Siakavellas SI, Daikos GL, Ladas SD (2013) Comparative study of candidate housekeeping genes for quantification of target gene messenger RNA expression by real-time PCR in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 19: 2840-2847.
208. Cummings M, Sarveswaran J, Homer-Vanniasinkam S, Burke D, Orsi NM (2014) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is an inappropriate housekeeping gene for normalising gene expression in sepsis. *Inflammation* 37: 1889-1894.
209. Montero-Melendez T, Perretti M (2014) Gapdh gene expression is modulated by inflammatory arthritis and is not suitable for qPCR normalization. *Inflammation* 37: 1059-1069.
210. Falzone L, Musso N, Gattuso G, Bongiorno D, Palermo CI, Scalia G, Libra M, Stefani S (2020) Sensitivity assessment of droplet digital PCR for SARS-CoV-2 detection. *Int J Mol Med* 46: 957-964.
211. Milbury CA, Zhong Q, Lin J, Williams M, Olson J, Link DR, Hutchison B (2014) Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. *Biomol Detect Quantif* 1: 8-22.
212. Yang R, Paparini A, Monis P, Ryan U (2014) Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of *Cryptosporidium* oocysts in faecal samples. *Int J Parasitol* 44: 1105-1113.
213. Weerakoon KG, Gordon CA, Cai P, Gobert GN, Duke M, Williams GM, McManus DP (2017) A novel duplex ddPCR assay for the diagnosis of schistosomiasis japonica. Proof of concept in an experimental mouse model. *Parasitology* 144: 1005-1015.
214. Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, Jerome KR (2013) Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clin Chem* 59: 1670-1672.

8 Thesen

1. Die qRT-PCR und ddPCR zeigen übereinstimmende Ergebnisse in Bezug auf das Vorliegen und die Richtung des gemessenen Effektes
2. Mit steigender Abweichung der ermittelten Daten von qRT-PCR und ddPCR vom Bereich der linearen dynamischen Reichweite nimmt die Diskrepanz des Effektausmaßes zwischen den Ergebnissen der beiden Verfahren zu
3. Die Ergebnisse von qRT-PCR und ddPCR zeigen in weiten Bereichen die im Vorfeld erwartete negativ-exponentielle Korrelation zueinander
4. Bestimmten CT-Werten lassen sich keine exakten Kopienzahlen/ μl zuweisen
5. Weder qRT-PCR noch ddPCR zeigen eine generelle Über- oder Unterschätzung eines Stimulations- bzw. Supplementierungseffektes
6. Die Stimulationseffekte der untersuchten Zielgene stimmen mit Ergebnissen der Literatur überein
7. Es kann kein generell anti-inflammatorischer bzw. pro-inflammatorischer Effekt einzelner verwendeter PUFA festgestellt werden
8. Keine der beiden angewandten Amplifikationsverfahren zeigt sich der jeweils anderen gegenüber als generell über- bzw. unterlegen

9 Selbstständigkeitserklärung

Kevin Kuhlmann

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

„Analyse von Änderungen der Genexpression mikrovaskulärer Endothelzellen im pro-inflammatorischen Milieu: Gegenüberstellung von relativer und absoluter Quantifizierung“

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

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

Halle (Saale), den 07.04.2021

Kevin Kuhlmann

10 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Kevin Kuhlmann, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind.

Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Halle (Saale), den 07.04.2021

Kevin Kuhlmann

11 Danksagung

Die Entstehung dieser Dissertation möglich gemacht haben viele Personen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

An erster Stelle möchte ich Professor Dr. Michael Bucher nennen. Ich danke ihm sehr für die Möglichkeit der Promotion, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten, finanziellen Mittel und die wertvolle Vermittlung von kompetenter und verlässlicher Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt Frau Privatdozentin Dr. habil. Julia Schumann. Durch den Vorschlag des Themas habe ich es ihr zu verdanken, dass diese Dissertation entstehen konnte. Mit ihrer wissenschaftlichen Expertise, ihrem weitreichenden Verständnis der Methodik und der außergewöhnlichen Hilfsbereitschaft hatte man in jeder Situation den richtigen Ansprechpartner zur Seite. Meinen aufrichtigen Dank für diese gute Betreuung.

Besonders danken möchte ich auch PD Dr. rer. nat. Gerald Schwerdt. Er führte mich in die Arbeit mit der ddPCR ein und hatte stets ein offenes Ohr für alle Anliegen und Probleme. Trotz seines großen wissenschaftlichen Arbeitspensums und vielen Mitarbeitern unter seiner Betreuung, fehlte es ihm nie an Geduld oder Ausdauer, und er unterstützte mich in vielen Situationen durch hilfreiche Tipps und ehrliches Feedback. Dafür meine ausdrückliche Bewunderung und meinen uneingeschränkten Dank.

Danken möchte ich darüber hinaus ganz besonders den Mitarbeitern des Forschungsteams der Anästhesie und operativen Intensivmedizin, insbesondere Melanie Cieselski, Simon Trommer, und Anja Leimert. Sie leisteten große Unterstützung im Labor und bei der Kultivierung der Zellen, welche für diese Arbeit verwendet wurden.

Ich möchte auch den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors der Physiologie ganz herzlich für ihre stetige Hilfsbereitschaft danken.

Einen besonderen Dank möchte ich auch meiner Kollegin und Freundin Marie-Christin Schulz aussprechen. Ihre Hilfe und freundliche Unterstützung zu jeder Zeit half mir in vielen Situationen sehr.

Nicht zuletzt danken möchte ich meinen guten Freunden Anna Fischer und Helmut Kolbe für ihre moralische Unterstützung während meines gesamten Studiums und auch im Rahmen der Dissertation. Widmen möchte ich diese Arbeit meinen Eltern Dagmar und Ralf Kuhlmann, meinen Großeltern Renate und Norbert Wuttke, meinem Bruder Dennis Kuhlmann sowie meiner Freundin Lisa Wagner. Ohne ihre Unterstützung und Liebe zu jeder Zeit wäre all dies niemals möglich gewesen.

Meinen allerherzlichsten Dank.