

**Sepsis-assoziierte Veränderungen in der Expression von mikroRNAs im Serum als
diagnostischer Biomarker**

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

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

von Fabian Link
geboren am 21.06.1994 in Goslar

Betreuerin:	Frau apl. Prof. Dr. rer. nat. Julia Schumann
Gutachter*innen:	Frau Prof. Dr. med. Heike Kielstein Herr PD Dr. med. Thomas Stüber, Hannover

06.04.2022

13.09.2022

Referat

Zur optimalen Behandlung septischer Patienten bedarf es einer zügigen und sicheren Diagnosestellung. Etablierte diagnostische Parameter erlauben bisher keinen sicheren Ausschluss anderer Differentialdiagnosen ohne weitere - oft therapieverzögernde - Untersuchungen. Ziel dieser Arbeit war daher zu untersuchen, ob Veränderungen in der Serumkonzentration von miRNAs bei septischen Patienten als sicheres diagnostisches Kriterium geeignet sind. Zur Ermöglichung weitergehender Studien wurde zudem nach konstitutiv exprimierten miRNAs („Housekeepern“) gesucht, die eine quantitative Bestimmung von miRNAs in septischem Milieu mit dem etablierten Routineverfahren qRT-PCR erlauben.

Für die Studie wurden Serumproben von Patienten mit gesicherter Sepsis, Patienten mit intensivmedizinischem Versorgungsbedarf ohne Sepsis sowie gesunden Probanden genutzt. Nach Auswahl potenzieller miRNA-Marker über Hochdurchsatz-Sequenzierung und Literaturrecherche wurde die Expression mittels ddPCR absolut quantifiziert und die diagnostische Aussagekraft mit klassischen Entzündungsmarkern und intensivmedizinischen Scoring-Systemen verglichen. Zur Identifizierung potenzieller Housekeeper-miRNAs wurden Zellkulturproben in septischem Milieu mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung untersucht und die Daten anschließend mithilfe von qRT-PCR und ddPCR validiert.

Alle in der Studie analysierten diagnostischen Parameter hatten nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Gegenüber den klassischen Entzündungsparametern CRP und WBC sowie den intensivmedizinischen Scores zeigte sich die einzelne Bestimmung von miRNAs als nicht überlegen. Die Berücksichtigung der Kopienzahl von miR-193-3p in einem modifizierten SOFA-Score führte jedoch zu einer klinisch relevanten Steigerung der Validität. Die Zusammenfassung mehrerer Parameter zu einem für diagnostische Zwecke optimierten Score könnte somit einen vielversprechenden Lösungsansatz für die Suche nach validen Sepsismarkern darstellen.

Zur Normalisierung von qRT-PCR-Daten konnten die konstitutiv exprimierten miRNAs let-7g-5p, let-7i-5p, miR-127-3p, miR-151a-5p (humane Endothelzelllinie „TIME“) sowie miR-16-5p, miR-27b-3p, miR-103a-3p und miR-423-3p (murine Makrophagenzelllinie „RAW 264.7“) identifiziert werden. Aufgrund ihrer Stabilität in besonderem Maße eignen sich hierbei miR-151a-5p, miR-27b-3p und miR-103a-3p. Die Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit gewebs- und milieuspezifischer Housekeeper für miRNA-Studien unter septischen Umgebungsbedingungen.

Link, Fabian: Sepsis-assoziierte Veränderungen in der Expression von mikroRNAs im Serum als diagnostischer Biomarker, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 66 Seiten, 2022

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

1	Einleitung und Zielstellung	1
1.1	Definition und Epidemiologie der Sepsis	1
1.2	Pathophysiologie	2
1.3	Klinisches Bild	4
1.4	Diagnostik	4
1.4.1	Klassische Laborparameter	5
1.4.2	Zytokine	6
1.4.3	Intensivmedizinische Scores	8
1.4.4	miRNAs	9
1.5	miRNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR	10
1.5.1	Housekeeper	10
1.5.2	ddPCR	11
1.6	Zielstellung	12
2	Diskussion	13
2.1	miRNAs in der Sepsis-Diagnostik	13
2.2	Housekeeper für miRNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR	16
2.3	Ausblick	17
3	Literaturverzeichnis	18
4	Thesen	26
5	Publikation I	27
6	Publikation II	45

Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbstständigkeitserklärung

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AUC	Area Under The Curve
CRP	C-reaktives Protein
cDNA	Complementary DNA
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern
ddPCR	Droplet Digital Polymerase Chain Reaction
DIC	Disseminated Intravasal Coagulation
DNA	Deoxyribonucleic Acid
GM-CSF	Granulomonocyte Colony Stimulating Factor
IFN- γ	Interferon- γ
IFNGR	IFN- γ -Rezeptor
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-1R1	Interleukin-1-Rezeptor-1
IL-1R2	Interleukin-1-Rezeptor-2
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
LPS	Lipopolysaccharid
miRISC	miRNA-induced Silencing Complex
miRNA	Micro Ribonucleic Acid
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
mTNF- α	Membrangebundener TNF- α
NLR	Neutrophil To Lymphocyte Ratio
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PCT	Procalcitonin
PRR	Pattern Recognition Receptor
ROC	Receiver Operating Characteristic
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
SAP-Score	Simplified Acute Physiology Score
sIL-6R	Soluble Interleukin 6 Receptor
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA-Score	Sequential Organ Failure Assessment Score
sTNF- α	Soluble Tumor Necrosis Factor α
TACE	TNF- α Converting Enzyme
TF	Tissue Factor

TLR3	Toll Like Receptor 3
TLR4	Toll Like Receptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNFR1	TNF- α -Rezeptor 1
TNFR2	TNF- α -Rezeptor 2
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
WBC	White Blood Cell Count

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Definition und Epidemiologie der Sepsis

In ihrer aktuell gültigen Definition aus dem Jahr 2016 ist die Sepsis beschrieben als ein infekti-
onsbedingtes Syndrom, bei dem eine überschießende Immunantwort über verschiedene moleku-
lare Pathomechanismen Endorganschäden und so ein lebensbedrohliches Multiorganversagen
verursacht [1]. Das Konsenspapier verschiedener Fachgesellschaften nennt für die Diagnosestel-
lung zwei zu erfüllenden Kriterien: (1.) eine Infektion mit einem Pathogen ohne spezifische Ein-
schränkungen bezüglich des Erregertyps und (2.) eine durch Dysregulation der Immunabwehr
bedingte Fehlfunktion eines Organs beziehungsweise Organsystems [1]. Anstoßpunkt einer Sep-
sis kann somit eine bakterielle, virale, parasitäre oder fungale Infektion sein, die über verschie-
dene klinische, labormedizinische und mikrobiologische Befunde nachgewiesen werden kann.
Das Kriterium des Organversagens wurde mittels des sequenziellen Organversagensbewertungs-
wert (Sequential Organ Failure Assessment Score, SOFA-Score) für die klinische Praxis operati-
onalisiert [1]. Sepsis ist folglich keine einheitliche Krankheitsentität. Vielmehr beschreibt eine
Sepsis die durch pathophysiologische Gemeinsamkeiten gekennzeichnete Endphase tödlich ver-
laufender Infektionskrankheiten. Das Vollbild der Erkrankung ist der septische Schock; hier füh-
ren erhebliche Störungen des Herz-Kreislaufsystems und des Zellstoffwechsels zu einem erheb-
lichen Anstieg der Patientensterblichkeit [1].

Das 1992 erstveröffentlichte und 2003 aktualisierte Konzept der Sepsis als infekti-
onsbedingter Subtyp des Systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (Systemic Inflammatory
Response Syndrome, SIRS) wurde mit der Neudefinition verlassen [2, 3]. Die bis dahin gültigen
SIRS-Kriterien hatten sich als zu unspezifisch erwiesen und waren unabhängig vom Vorliegen
einer Sepsis auf einen Großteil der kritisch kranken Patienten auf einer Intensivstation anwendbar
[4]. Über die Neudefinition wurde eine Abgrenzung gegenüber weniger lebensbedrohlichen so-
wie nichtinfektiös bedingten Krankheitszuständen geschaffen [1]. Die Untergruppe der schweren
Sepsis wurde nicht in das aktualisierte Konsenspapier übernommen, wobei sich durch Berück-
sichtigung der Organdysfunktion in den Sepsiskriterien das Spektrum in den Bereich der
Schwerstkranken verschob.

Die Sepsis ist von einer hohen Letalität geprägt. Auch in hochentwickelten Ländern ist die effek-
tive Behandlung weiterhin eine Herausforderung. Eine Metaanalyse zur globalen Inzidenz der
Sepsis schätzte für die Jahre 2003-2015 jährlich 437 Fälle pro 100 000 Personen bei einer Sterb-
lichkeit von 21% [5]. Das entspräche etwa 31,5 Millionen Sepsisfällen und über fünf Millionen
tödlicher Verläufe weltweit [5].

In Deutschland gab es von 2007 bis 2013 mit steigender Tendenz jährlich 256–335 registrierte Fälle pro 100 000 Einwohner mit einer Krankenhaussterblichkeit von 24,3-27,0% trotz guter Verfügbarkeit intensivmedizinischer Versorgung [6]. Männer hatten im Vergleich zu Frauen ein 1,8-faches Risiko eine Sepsis zu entwickeln und ein 2-faches Risiko zu versterben [6].

Eine jüngere Studie zur Epidemiologie der Sepsis in den USA ermittelte eine Gesamtsterblichkeit von 12,5%, konnte zwischen den Geschlechtern allerdings keinen signifikanten Unterschied ermitteln [7]. Eine besonders hohe Letalität von 45% zeigte sich in einer französischen Studie aus 2005 für Septitiden bei nosokomial erworbener Infektion [8]. Die Vergleichbarkeit dieser epidemiologischen Untersuchungen ist mitunter begrenzt, da diese auf uneinheitlichen Krankheitsdefinitionen und diagnostischen Kriterien beruhen. Dennoch zeigen die Daten ein weiterhin bestehendes erhebliches Sterblichkeitsrisiko für betroffene Patienten.

1.2 Pathophysiologie

Definitionsgemäß kommt es bei der Sepsis durch eine Infektion zur dysregulierten und systemischen Immunantwort, die im Gegensatz zur geordneten und lokalen Reaktion auf Pathogene die patienteneigenen Organsysteme schädigt. Die Immunantwort wird durch Zellen der angeborenen Abwehr initial aktiviert [9]. Zu diesen gehören dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, Monozyten und die sich hieraus entwickelnden Makrophagen [9].

Nach Eindringen eines Keims erfolgt die Bindung von hochkonservierten Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (Pathogen-associated Molecular Patterns, PAMPs), welche sich auf der Oberfläche der Krankheitserreger befinden, an die Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs) zirkulierender Abwehrzellen [10]. Zu den PRRs gehören neben den Toll-like-Rezeptoren auch die RIG-1-like-Rezeptoren, NOD-like-Rezeptoren und C-Typ-Lektin-Rezeptoren [10]. Verschiedene Rezeptortypen binden hierbei an unterschiedliche, zum Teil erregerspezifische Biomoleküle. So besitzt etwa der Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3) eine Spezifität für virale doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid, DNA) [11], während der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) durch das Lipopolysaccharid (LPS) aus der äußeren Membran gramnegativer Bakterien aktiviert wird [12]. Einige der PRR reagieren auch auf Gefahren-assoziierte molekulare Muster (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs), die nicht von Pathogenen stammen, sondern durch Schädigung körpereigener Zellen freigesetzt werden [13]. Beispielfhaft seien die zytoplasmatischen Moleküle Adenosintriphosphat, Harnsäure, das S100-Protein sowie die nukleären Proteine HMGB1 und HMGN1 genannt [13]. Abhängig vom jeweiligen Rezeptor und der exprimierenden Zelle führt eine Ligandenbindung zur Aktivierung vielfältiger Signalkaskaden, an deren Ende die Bildung immunmodulatorischer Mediatoren steht [10]. So führt eine Bindung von LPS an TLR4 über die Aktivierung des Myeloid-Differentiation-Primary-Response-

Gene-88 (MyD88)-abhängigen Signalwegs sowie des Toll-IL-1-Resistance-Domain-containing-Adaptor-inducing-IFN- β (TRIF)-abhängigen Signalwegs zur Bildung der Effektoren C-X-C-motif-Ligand 10 (CXCL10), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierenden Faktor (Granulomonocyte Colony Stimulating Factor, GM-CSF), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10) sowie der induzierbaren NO-Synthase (inducible NO Synthase, iNOS) [14, 15].

Über die Freisetzung dieser Effektoren durch ansässige Immunzellen werden umliegende Gefäße zur besseren Durchblutung des Gewebes dilatiert [16]. Das Endothel schüttet chemotaktische Zytokine aus und exprimiert adhäsive Moleküle auf der Oberfläche, um eine Einwanderung weiterer Abwehrzellen in das Gewebe zu ermöglichen [16]. Vermittelt über Selektine und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1, VCAM-1), das an $\alpha 4 \beta 1$ -Integrin auf Leukozyten bindet, werden an der Gefäßwand entlangströmende Abwehrzellen gebremst und die Transmigration ins Gewebe initiiert [16]. Durch diese Rekrutierung zusätzlicher Immunzellen soll eine lokale Infektionskontrolle erreicht werden. Das besser durchblutete Gewebe erwärmt sich und schwillt durch eine erhöhte Endothelpermeabilität an [17]. Die ausgeschütteten Zytokine führen über Sensibilisierung von Nozizeptoren zu Hyperalgesie [17]. So kommt es zu den klassischen Zeichen der Entzündung: Rötung, Schwellung, Schmerz, Überwärmung und Einschränkung der Funktion [17].

Die gleichzeitige Freisetzung entzündungsfördernder wie -hemmender Faktoren moduliert und begrenzt die Inflammation [18]. Die Aktivität des Immunsystems fokussiert sich so auf das befallene Kompartiment [18]. Wird die Erregerausbreitung jedoch nicht eingedämmt, können die Pathogene kontinuierlich umliegende Gewebe infizieren und schließlich über hämatogene oder lymphogene Absiedlung in eine Allgemeininfektion übergehen. Infolgedessen kann es durch eine übermäßige Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Rahmen eines „Zytokinsturms“ zur Dysbalance der Mediatoren und Überaktivierung des Immunsystems kommen. Das eigentlich streng lokale entzündliche Milieu folgt der Allgemeininfektion nach und generalisiert [19].

Parallel zur Organschädigung durch übermäßige Immunaktivität lässt sich bei septischen Patienten insbesondere nach prolongiertem Krankheitsverlauf auch eine erworbene Immundefizienz durch Apoptose von Zellen der angeborenen und erworbenen Abwehr beobachten [20]. Das Ausmaß des lymphozytären Zelluntergangs ist über eine gesteigerte Anfälligkeit für Sekundärinfektionen mit dem Outcome assoziiert [21].

1.3 Klinisches Bild

Die individuellen Ausprägungen der Sepsis sind vielfältig. Neben der Konstitution des Patienten spielen hier insbesondere das jeweilige Pathogen und die aktivierten inflammatorischen Signalkaskaden eine entscheidende Rolle [22]. Die pathophysiologischen Korrelate auf Gewebeebene sind Endothelschädigung sowie gestörte Vasomotorik; die resultierende Schrankenstörung führt zum Austritt von Flüssigkeit, Proteinen und Zellen in das Interstitium [23]. Typische Folgen sind ein akutes Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) durch eine diffuse Schädigung des pulmonalen Gewebes mit Diffusionsstörung, ein akutes Nierenversagen bei Beteiligung renaler Gefäße und die septische Enzephalopathie bei desintegrierter Blut-Hirn-Schranke [9]. Das Herz-Kreislaufsystem ist aufgrund einer massiven Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch die iNOS beeinträchtigt [24]. Es kommt zur reduzierten kardialen Kontraktilität mit kombinierter systolisch-diastolischer Dysfunktion sowie zu massiver Vasodilatation mit konsekutivem Blutdruckabfall bis zum Schock [24]. Initial ist der kardiale Auswurf trotz myokardialer Dyskinesie durch den reduzierten Gefäßwiderstand erhöht, im Verlauf fällt dieser jedoch ab und es kommt zur peripheren Minderperfusion [24].

Eine erhöhte Expression von Gewebefaktor (Tissue Factor, TF) auf Monozyten, die gesteigerte Freisetzung prokoagulatorischer Faktoren und eine gestörte Endothelfunktion begünstigen die intravasale Gerinnung [25]. Entsprechend kann sich im Rahmen einer Sepsis eine disseminierte intravasale Koagulation (Disseminated Intravascular Coagulation, DIC) mit sowohl zahlreichen Thrombosen als auch einer Blutungsneigung durch verbrauchte Gerinnungsfaktoren entwickeln [25].

Die im Verlauf der Erkrankung auftretende Immunsuppression kann über sekundäre Infektionen oder Reaktivierung latenter Virusinfektionen zu weiteren Komplikationen führen [20].

1.4 Diagnostik

Aufgrund der vielfältigen Ausprägungen des Krankheitsverlaufs und der Notwendigkeit früher Intervention bei einem fulminantem Fortschreiten der Organschäden ist eine rein klinische Diagnosestellung problematisch [26]. Zwar ist die Sepsis in der revidierten Definition klar als Anstieg des SOFA-Scores um 2 Punkte bei Infektionsnachweis operationalisiert, für die klinische Praxis sind diese Kriterien zur frühzeitigen Diagnostik jedoch nur eingeschränkt geeignet. Insbesondere der sichere Infektionsnachweis, der meist per mikrobiologischer Anzucht gelingt, ist ein zeitaufwendiger Prozess. In einer pädiatrischen Multicenterstudie von 2014 dauerte es durchschnittlich 15,4 Stunden bis zu einem ersten positiven Blutkulturbefund, erst 24 Stunden nach Probenentnahme waren 90% der Erreger bestimmt [27]. Für einzelne Erregerarten lag die durchschnittliche

Bestimmungszeit bei bis zu 59 Stunden [27]. Dem entgegen steht die Zielstellung des „one hour sepsis bundle“: diese zielt auf einen strukturierten Beginn der Behandlung inklusive antiinfektiver Maßnahmen binnen einer Stunde nach Krankenhausaufnahme ab, da eine verzögerte Diagnose als outcomerelevanter Parameter identifiziert wurde [28, 29]. Auch ist die Sensitivität der Blutkultur als mikrobiologischer Goldstandard in der Sepsisdiagnostik in Abhängigkeit von der Anzahl der entnommenen Blutkulturen deutlich eingeschränkt [28, 30]. Eine in der klinischen Praxis häufig vorkommende vorzeitige Gabe von Antibiotika kann die Detektionsrate weiter reduzieren [31].

Die Surviving Sepsis Campaign definierte daher bereits im Jahr 2018 die Identifizierung von Biomarkern, die eine frühzeitige und verlässliche Sepsisdiagnostik ermöglichen, als eines der wichtigsten Forschungsziele zur Verbesserung der Patientenoutcomes [32]. Die Studienlage konnte hierbei – trotz zahlreicher Untersuchungen zu verschiedenen Biomolekülen – noch keinen optimalen Krankheitsmarker validieren.

1.4.1 Klassische Laborparameter

Weit verbreitet in der Diagnostik der Sepsis sind die klassischen Inflammationsmarker Leukozytenzahl im Vollblut (White Blood Cell Count, WBC) sowie die Konzentrationen der Eiweiße C-reaktives Protein (CRP) und Procalcitonin (PCT) im Serum [33].

Der WBC ist ein weltweit verfügbarer und kostengünstig bestimmbarer Parameter, der hierdurch in der Routinediagnostik entzündlicher Krankheitszustände große Verbreitung gefunden hat. Allerdings ist die Leukozytenzahl auch beeinflusst durch zahlreiche andere Faktoren – etwa hämatologisch-onkologische Krankheiten, Glukokortikoidbehandlung, Traumata, Schwangerschaft, Tabakkonsum und ein hohes Lebensalter [34-37]. Entsprechend zeigten sich in Studien zur diagnostischen Aussagekraft bei Sepsis Sensitivitäten und Spezifitäten von unter 60% [38-41]. Die Feindifferenzierung der Leukozyten zur Berechnung des Neutrophilen-Lymphozyten-Quotienten (Neutrophil To Lymphocyte Ratio, NLR) kann hierbei die diagnostische Validität steigern [42, 43].

CRP gehört zur Gruppe der Akute-Phase-Proteine [44]. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Plasmaproteinen, deren Konzentration sich im Rahmen akuter und chronischer entzündlicher Prozesse kurzfristig verändert [44]. Das aus fünf gleichen Untereinheiten bestehende cyclische Pentamer CRP wird maßgeblich in der Leber synthetisiert und wirkt regulatorisch auf verschiedene Zellen der angeborenen Abwehr und das Gerinnungssystem [45]. Bei gleichzeitiger Bindung

von Komplementfaktor C1q und Phosphocholin, das auf der Oberfläche bakterieller, eukaryotischer und fungaler Zellen vorkommt, hat CRP zudem eine opsonierende Wirkung [45]. Für die Diagnostik infektiöser Prozesse wurden für den CRP-Spiegel im Blut eine höhere Sensitivität und Spezifität dokumentiert als für den WBC [46, 47]. Durch inflammatorische Stimuli wird eine erhebliche Veränderung der Plasmakonzentrationen bewirkt; gegenüber gesunden Personen kann die Konzentration um den Faktor >300 vergrößert sein [44]. Zur Differentialdiagnose der Sepsis bei kritisch kranken Patienten ist allerdings auch dieser Marker nur eingeschränkt geeignet [48, 49]. Störfaktoren, die den individuellen Ausgangswert gegenüber der Normalbevölkerung verändern und so die Interpretation veränderter CRP-Spiegel erschweren können, sind unter anderem onkologische, rheumatologisch-autoimmune, hepatologische und pulmologische Erkrankungen, Alter und Adipositas [37, 50-54].

Ebenfalls zur Gruppe der Akute-Phase-Proteine gehört PCT, der Protein-Vorläufer des Proteohormons Calcitonin [55]. Zur Regulation der Calcium-Homöostase wird Preprocalcitonin in den neuroendokrinen C-Zellen der Schilddrüse synthetisiert, aus dem proteolytisch PCT und hieraus das hormonell aktive Calcitonin gebildet werden [55]. Das bei entzündlichen Prozessen zum Teil um mehrere Größenordnungen ansteigende PCT im Blutplasma stammt jedoch nicht aus der Schilddrüse; vielmehr wird durch Zytokine eine Synthese in zahlreichen extrathyreoidalen Geweben, unter anderem in Leber, Lunge und Hoden stimuliert [56-58]. Zahlreiche Studien haben die Eignung von PCT in der Sepsisdiagnostik untersucht, häufig im direkten Vergleich mit CRP. In einer großen Metaanalyse aus dem Jahr 2006 konnte sowohl eine erhöhte Sensitivität als auch diagnostische Genauigkeit nachgewiesen werden. Dennoch blieb bei Diagnostik auf PCT-Basis der Serumspiegel in jedem fünften Kasus unter den in den Studien gesetzten Grenzwerten, sodass auch dieser Parameter nicht als eindeutig interpretierbare Lösung betrachtet werden kann [59]. Dieses Ergebnis bestätigte sich in auch einer jüngeren Metaanalyse aus dem Jahr 2013 [60].

1.4.2 Zytokine

Die Zell-Zell-Kommunikation zur Regulation der Proliferation und Differenzierung von Immunzellen bei entzündlichen Prozessen wird vermittelt über die Ausschüttung und Rezeption von Zytokinen [9]. Zu dieser heterogenen Gruppe von Proteinen gehören sowohl proinflammatorische (TNF- α , Interleukin 1, IL-6, Interleukin 12, Interferon- γ (IFN- γ), Makrophagen-Migrations-inhibierender-Faktor) als auch entzündungshemmende (Interleukin 4, Interleukin 10, transformierender Wachstumsfaktor β) Mediatoren, die ihre Wirkung über eine Vielzahl von Signalkaskaden entfalten [61]. Im Rahmen der Sepsis nehmen proinflammatorische Zytokine eine zentrale Rolle ein: die Ausschüttung unphysiologisch hoher Mengen der Mediatoren im Rahmen eines „Zytokinsturms“ wird als grundlegender pathophysiologischer Mechanismus betrachtet, was etwa

durch die Anwendung zytokinadsorbierender Verfahren auch in der klinischen Praxis berücksichtigt wird. [62, 63]. Die Messung der Serumkonzentration bestimmter Zytokine zur Diagnostik der Sepsis wurde bereits früh diskutiert. Im Fokus standen vorrangig TNF- α und IL-6.

TNF- α wird maßgeblich nach Stimulation von Gewebsmakrophagen der monozytären Linie (Langerhans-Zellen, Hortege-Zellen, Kupffer-Zellen, Alveolarmakrophagen) sezerniert [64]. Hierfür wird membrangebundener TNF- α auf der Leukozytenoberfläche durch das TNF- α -konvertierende Enzym proteolytisch zum aktiven löslichen TNF- α gespalten [64]. Seine Wirkung als proinflammatorischer Mediator entfaltet TNF- α durch Bindung an die TNF- α -Rezeptoren Typ 1 und 2 (TNFR1, TNFR2) [64]. Über diese wirkt der Mediator unter anderem regulierend auf die Proliferation und Apoptose von Makrophagen sowie stimulierend auf die Migration von Makrophagen ins Gewebe [64]. Die Studienlage zu erhöhten Blutspiegeln von TNF- α bei septischen Patienten ist uneindeutig, möglicherweise bedingt durch eine kurze Halbwertszeit und dadurch hohe Abhängigkeit des Messergebnisses vom Zeitpunkt der Probenentnahme [65-67].

Das ebenfalls proinflammatorisch wirkende IFN- γ ist der einzige Vertreter der Typ-II-Interferone und wird hauptsächlich von Zellen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr ausgeschüttet [68]. Stimulation durch Interleukin-12 und Interleukin-18 führt bei Antigen-präsentierenden Zellen, NK-Zellen und T-Lymphozyten zur Sekretion von IFN- γ [68]. IFN- γ hat insbesondere in Frühphasen einer Infektion eine relevante direkte antivirale Wirkung. Über Bindung an den IFN- γ -Rezeptor (IFNGR) vermittelt es zudem immunmodulatorische Effekte durch Regulation der Transkription zahlreicher Gene [68]. Obwohl mechanistische Überlegungen, die einen Anstieg des IFN- γ -Serumspiegels bei Sepsis vermuten, anhand der physiologischen Wirkung des Zytokins plausibel erscheinen, konnte dieser Zusammenhang bisher nicht empirisch bestätigt werden [69].

Das zur Interleukin-1-Zytokinfamilie gehörende IL-1 β wird größtenteils von aktivierten Makrophagen synthetisiert [70]. Seine Wirkung vermittelt IL-1 β durch die Bindung an Interleukin-1-Rezeptor-1 (IL-1R1) und Interleukin-1-Rezeptor-2 (IL-1R2), die beide sowohl in membrangebundener als auch löslicher Form vorkommen [70]. IL-1R1 wird von Fibroblasten, T-Lymphozyten und Gefäßendothelzellen gebildet, wohingegen sich IL-1R2 insbesondere auf den Zellen der Blutbildung sowie B-Lymphozyten findet [70]. Während IL-1R1 über MyD88-stimulierte Signalwege intrazelluläre Prozesse reguliert, ist IL-1R2 ein Köderrezeptor ohne gekoppelte intrazelluläre Wirkung – seine Expression auf Zellen wirkt demzufolge hemmend auf die umliegenden IL-1R1 [70]. An IL-1R1 gebundenes IL-1 β bewirkt als entzündungsfördernder Mediator eine Freisetzung von Vasodilatoren und chemotaktischer Stoffe, wodurch eine verstärkte Leukozy-

teneinwanderung erreicht wird [70]. Über die Bildung entzündungsfördernder Prostaglandine induziert IL-1 β eine Erhöhung der Körperkerntemperatur bis zum Fieber [71]. Zur Eignung des IL-1 β als diagnostischer Sepsismarker wurden bisher keine klinischen Studien veröffentlicht.

IL-6 konnte als einziges Zytokin Relevanz als klinisch-chemischer Parameter in der Praxis etablieren [72]. Insbesondere wird es im Bereich der pädiatrischen Intensivmedizin eingesetzt, da bei Neonaten die eingeschränkte Leberfunktion eine deutlich reduzierte Akute-Phase-Antwort bedingt, wodurch CRP und PCT keine vergleichbaren Anstiege wie bei erwachsenen Patienten zeigen [72]. Das Zytokin wird hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen produziert, kann aber auch von B- und T-Lymphozyten, Endothelzellen sowie von Binde- und Fettgewebe sezerniert werden [73]. Man unterscheidet bei der IL-6-Wirkung den klassischen Signalweg vom trans-Signalweg [74]. Der klassische Signalweg vermittelt antiinflammatorische Wirkungen über den membrangebundenen Interleukin-6-Rezeptor (mIL-6R) und ist limitiert auf Zellen mit Expression von mIL-6R [73, 74]. Dagegen wirkt der trans-Signalweg über den löslichen Interleukin-6-Rezeptor (sIL-6R), welcher über das ubiquitär gebildete Glykoprotein-130 auch an Zellen ohne mIL-6R binden und dort proinflammatorische Effekte bewirken kann [73, 74]. Wichtige systemische Wirkungen des IL-6 sind etwa die Initiierung der Akuten-Phase-Reaktion und die Modulierung von Zellbildung und -differenzierung im Rahmen der Entzündung [73, 74]. Septische Patienten zeigen erhöhte Serumspiegel von Interleukin-6, die mit Krankheitsschwere und dem Patientenoutcome korrelieren [75, 76]. Zur diagnostischen Validität bei erwachsenen septischen Patienten existieren einige Studien, die einen Vorteil in der diagnostischen Präzision gegenüber den Akute-Phase-Proteinen anzeigen [67, 77, 78]. Allerdings gibt es auch hier Störvariablen. So steigt der IL-6-Serumspiegel selbst nach gering invasiven chirurgischen Eingriffen und im Rahmen einer Transplantatreaktion signifikant an [79, 80].

1.4.3 Intensivmedizinische Scores

Ein medizinischer Bewertungswert (Score) ist eine Erhebung, die verschiedene Messwerte unterschiedlicher physikalisch-chemischer Einheiten auf einen Punktwert reduziert, um eine spezifische Fragestellung zu beantworten. In der Intensivmedizin werden verschiedene Scoring-Systeme zur Beurteilung der Patienten eingesetzt. Häufige Anwendung finden der Vereinfachte-Akut-Physiologie-Bewertungswert (Simplified Acute Physiology Score, SAP-Score) sowie der SOFA-Score.

Der SAP-Score in der revidierten zweiten Version fasst Alter sowie einige Vital- und Laborparameter zusammen, um den allgemeinen gesundheitlichen Zustand des Patienten auf einer Punkteskala von 0 bis 163 zu beschreiben [81]. Ein höherer Punktwert zeigt hierbei eine schlechtere

körperliche Verfassung an [81].. Entwickelt wurde der Score für die Einschätzung von Probanden klinischer Studien, anschließend folgte die Validierung für die Verwendung als klinischer Prognoseschätzer [82, 83].

Der SOFA-Score dagegen wurde initial entworfen, um den progredienten Organausfall bei intensivmedizinischen Patienten im Zeitverlauf abzubilden [84]. Aus sechs Vital- und Laborparametern wird hier ein Punktwert von 0 bis 34 bemessen, der ebenfalls mit einem schlechterem Allgemeinzustand ansteigt [84]. Auch für den SOFA-Score wurde in einigen Studien der Nutzen für die Prognosestellung untersucht und bestätigt [84-86].

Insgesamt handelt es sich sowohl beim SAP- als auch SOFA-Score um gut validierte Werkzeuge zur Prognoseabschätzung bei kritisch kranken Patienten, ihre Wertigkeit in der Diagnosefindung wurde dagegen bislang nicht diskutiert.

1.4.4 miRNAs

Mikro-Ribonukleinsäuren (Micro Ribonucleic Acid, miRNA) sind kurzkettige Nukleinsäuren mit einer Länge von 18-24 Basenpaaren, die nicht selbst in Eiweiße translatiert werden, sondern in der Steuerung der Genexpression wirksam sind. Hierfür kann eine miRNA durch Bindung an bestimmte intrazelluläre Proteine einen miRNA-induzierten Silencing-Komplex (miRNA-Induced Silencing Complex, miRISC) bilden [87]. Der miRISC als funktionelle Einheit bindet dann an Boten-Ribonukleinsäuren (Messenger Ribonucleic Acid, mRNA); in Abhängigkeit von der Komplementarität der Basenpaare kommt es dadurch zur Hemmung der Translation oder Zerstörung der mRNA [87]. Insgesamt sind derzeit (Stand 03/2022) 1917 verschiedene miRNAs beim Menschen bekannt [88].

Entsprechend ihrer Funktion finden sich miRNAs im Zytosol; sie konnten jedoch auch in allen anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, wobei unklar ist, ob freie miRNA eine biologische Funktion hat [89]. Mit Nachweis der freien miRNA stellte sich die Frage nach der Eignung als Biomarker, zuerst im Bereich der Onkologie. Hier gibt es bereits zahlreiche Studien, die miRNA-Spiegel als sowohl diagnostische als auch prognostische Tumormarker validieren [90]. Auch im Bereich der Sepsisdiagnostik wurden einige Studien zur Eignung spezifischer miRNAs durchgeführt. Bei genauerer Betrachtung der Literatur fällt auf, dass die in den Untersuchungen erhobenen Daten zum Teil widersprüchlich sind [91-95]. Zwar konnte in den Studien jeweils für spezifische miRNAs ein Anstieg der Serumkonzentration bei septischen Patienten festgestellt werden, eine Bestätigung der postulierten miRNA-Marker über mehrere Studien hinweg gelang

jedoch bisher nicht. Neben den unterschiedlichen zugrunde liegenden Sepsisdefinitionen kann eine mögliche Erklärung in der diffizilen Quantifizierung von miRNAs liegen.

1.5 miRNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR

Um miRNAs als Biomarker für Erkrankungen wissenschaftlich untersuchen und gegebenenfalls langfristig auch in der klinischen Praxis nutzen zu können, ist eine zuverlässige Quantifizierungsmethode vonnöten. Mit der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) steht den Laboren hierfür ein etabliertes Bestimmungsverfahren zur Verfügung.

Zur Quantifizierung einer spezifischen doppelsträngigen DNA mittels qRT-PCR wird die aufbereitete Probe mit thermostabiler DNA-Polymerase, dem für die Reaktion notwendigen Substrat und Primern versetzt [96]. Primer sind kurze Oligonukleotide, deren Basenabfolge komplementär zu den Einzelsträngen der zu untersuchenden Nukleinsäure ist [96]. Für die Untersuchung von RNA-Proben muss vor Durchführung einer qRT-PCR die RNA in komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wird die Probe mit dem ursprünglich in Retroviren entdeckten Enzym Reverse Transkriptase versetzt [97]. Die Erhitzung der cDNA-Probe und das anschließende Abkühlen in einem Thermocycler führen zur Aufspaltung des Doppelstranges und Bindung der Primer an die komplementären Einzelstränge, sodass nach einer erneuten Temperaturanpassung die DNA-Polymerase den gebundenen Primer-Strang vervollständigt [96]. An die nun doppelsträngige DNA kann sich ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff anlagern, dessen Fluoreszenzausbeute hierdurch zunimmt [98]. Dies kann über eine optische Messeinrichtung im Thermocycler über den Verlauf der PCR gemessen werden [96].

Durch Wiederholung dieser Reaktionszyklen kommt es zur Vervielfältigung des ursprünglichen Probenmaterials mit initial exponentiellem Anstieg gefolgt von einer Sättigungsphase durch erschöpfte Substrat- und Primermengen [96]. Analog zur zunehmenden DNA-Menge steigt auch die Menge interkalierten Farbstoffs und somit die Lichtemission an. Überschreitet die gemessene Lichtmenge einen definierten Grenzwert, wird dies als qualitativer Nachweis für das jeweils untersuchte Gen gewertet. Die Zahl der benötigten Replikationszyklen bis zum Überschreiten des Grenzwerts, der Schwellen-Zyklus (cycle threshold, Ct), gibt dann eine semiquantitative Auskunft über die ursprüngliche Substratmenge [99].

1.5.1 Housekeeper

Um die Qualität quantitativer Bestimmungen zu verbessern, müssen in den Proben konstitutiv exprimierte Gene (housekeeping genes, Housekeeper) als interne Kontrolle mitbestimmt werden [99, 100]. Die Expression des Zielgens wird dann innerhalb der Probe zur Housekeeperexpression ins Verhältnis gesetzt, um interindividuelle biologische Varianz sowie systemische Fehler, die im

Rahmen der Probenbearbeitung entstehen, zu korrigieren [100, 101]. Hierbei muss eine von den Versuchsbedingungen unabhängige, stabile Expression des Housekeepers gewährleistet sein, da ansonsten die Normalisierung fehlschlägt und die Qualität des Datensatzes erheblich gemindert wird [102]. Aufgrund der geringen Zahl an Basenpaaren und der typischen räumlichen Haarnadel-Struktur von miRNAs sind die in der DNA-Analytik häufig genutzten, deutlich längeren Housekeeper untauglich [102]. Hier ist eine Anpassung für miRNA-Studien notwendig; prinzipbedingt eignen sich durch analoge biochemische Eigenschaften hierfür insbesondere andere miRNAs [102, 103]. Problematisch für die Auswahl eines Housekeepers für Studien unter septischen Bedingungen ist der Umstand, dass in stark inflammatorisch geprägten Milieus konstitutiv exprimierte Housekeeper alterniert sein können, die durch andersartige Experimentalbedingungen kaum beeinflusst werden [104-106].

1.5.2 ddPCR

Eine Alternative zur Housekeeper-abhängigen Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels qRT-PCR ist die absolute Quantifizierung per digitaler Tröpfchen-Polymerasekettenreaktion (Digital Droplet Polymerase Chain Reaction, ddPCR).

Bei dieser Variante der PCR wird vor Eingabe der Probe in den Thermocycler durch Zugabe von Öl eine Wasser-in-Öl-Emulsion hergestellt [107]. Durch spezielle technische Verfahren wird anschließend das Probenvolumen in dieser Emulsion auf etwa zwanzigtausend Tröpfchen mit einem Volumen von einem Nanoliter aufgeteilt [107]. In jedem Tröpfchen läuft nun im Thermocycler separat voneinander die Amplifikation der cDNA ab [107]. Hierbei finden keine Zwischenmessungen statt; Amplifikation und Messung sind getrennte Experimentalschritte [107]. Nach Abschluss einer vordefinierten Anzahl an PCR-Zyklen wird nun die Probe, vergleichbar mit der Durchflusszytometrie, über feine Kapillaren geführt und die Fluoreszenzantwort jedes Tröpfchens separat bestimmt [107]. Die Verteilung der cDNA-Moleküle bei der Generierung der Tröpfchen folgt der Poisson-Verteilung, sodass sich die absolute Anzahl an Nukleinsäuremolekülen statistisch berechnen lässt [107]. Durch die absolute Quantifizierung besteht bei der ddPCR keine Notwendigkeit, einen Housekeeper zu verwenden. Die ddPCR ist demzufolge auch für Untersuchungen geeignet, für deren Experimentalbedingungen noch keine validierte Referenznukleinsäure vorliegt.

1.6 Zielstellung

Die Rolle der miRNAs für die Diagnostik der Sepsis ist insgesamt unklar. Zwar wurden bereits Studien publiziert, die einen diagnostischen Mehrwert gegenüber anderen molekularen Markern postulieren, den Weg in die Routinediagnostik fand dies bisher jedoch nicht. Die in diesem Themenfeld bislang durchgeführten Untersuchungen, die maßgeblich auf eine Quantifizierung der miRNAs mittels qRT-PCR setzten, weisen nur eine eingeschränkte externe Validität auf. Durch die Verwendung nicht validierter Referenznukleinsäuren ist die Übertragbarkeit der Datensätze stark eingeschränkt. Zudem fand selten ein unmittelbarer Vergleich mit anderen diagnostischen Verfahren statt, was die abschließende Bewertung erschwert. Eine Zielstellung dieser Arbeit war daher, mittels einer Housekeeper-unabhängigen Methode zu evaluieren, welches Potenzial miRNAs für die Sepsisdiagnostik bieten. Zur besseren Einordnung der Ergebnisse wurden WBC, CRP, proinflammatorische Zytokine sowie SOFA- und SAP-Score bei derselben Studienkohorte erhoben. Um die Aussagekraft der Studie zu erhöhen, wurde die Kohorte der Sepsispatienten mit zwei Kontrollgruppen verglichen: neben einer Kontrollgruppe bestehend aus gesunden Probanden wurde zusätzlich eine zweite Kontrollgruppe aus nichtseptischen Intensivpatienten in die Studie integriert.

Damit bei möglicher hoher diagnostischer Güte eines miRNA-Markers weitere Studien und eine Implementierung in die Routinediagnostik gelingen können, muss eine Quantifizierung mittels qRT-PCR ermöglicht werden, die das etablierte Standardverfahren in wissenschaftlichen und klinisch-chemischen Laboren darstellt. Entsprechend war eine weitere Zielstellung der vorliegenden Arbeit die Identifizierung eines geeigneten Housekeepers für miRNA-Studien unter septischen Bedingungen. Auf Basis von Zellkulturproben im inflammatorischen Milieu wurde mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung nach besonders stabilen miRNAs gesucht. Anschließend wurden die Ergebnisse mittels qRT-PCR und ddPCR-Versuchen validiert. Zur Prüfung eines potentiellen Einflusses des Zelltyps auf die miRNA-Expression wurde die Untersuchung sowohl mit der endothelialen Zelllinie TIME als auch mit der Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 durchgeführt, um so nicht nur milieu-, sondern auch gewebespezifische Haushaltsgene zur Verfügung zu stellen.

2 Diskussion

2.1 miRNAs in der Sepsis-Diagnostik

Auch für die moderne Medizin stellt die Behandlung septischer Patienten mit ihrer komplexen Pathophysiologie und den vielfältigen akuten und chronischen Folgeschäden eine Herausforderung dar. Für das Outcome der Patienten ist dabei entscheidend, dass die Behandlung nicht durch einen langen Diagnoseprozess verzögert wird [28, 29]. Durch einen idealen Biomarker könnte die Diagnosefindung deutlich vereinfacht und beschleunigt werden. Die etablierten Entzündungszeichen wie CRP oder WBC sind jedoch unspezifisch und können für sich stehend weder eine Diagnose sichern noch ausschließen. Die Identifizierung neuer Laborparameter mit höherer Sensitivität und Spezifität für Sepsis ist daher eines der vorrangigen Forschungsziele zur Verbesserung der Patientenversorgung [32].

Die miRNAs sind eine vielfach diskutierte Molekülklasse, für die jedoch häufig in Studien an Sepsispatienten kein diagnostischer Mehrwert belegt werden konnte. Einige wenige Autoren beschreiben für ausgewählte miRNAs herausragende Eigenschaften [91-95]. Bei kritischer Prüfung dieser Forschungsliteratur fällt jedoch auf, dass bezüglich der möglichen Marker-miRNAs große Uneinigkeit besteht [91-95]. Trotz weitgehender methodischer Überschneidung kommen die Studien mit jeweils hoher statistischer Effektstärke und Signifikanz zu widersprüchlichen Ergebnissen, sodass eine abschließende Bewertung bisher nicht möglich war. Diese inkonsistente Datenlage könnte durch fehlerhafte Normalisierung von Rohdaten zu erklären sein. Das häufig in Studien zur Quantifizierung von miRNAs genutzte Verfahren der qRT-PCR erfordert diesen Datenbearbeitungsschritt, um biologische Schwankungen und Ungenauigkeiten in der manuellen Durchführung der Experimente zu korrigieren [99]. Dabei ist die Qualität der normalisierten Daten unmittelbar vom gewählten Housekeeper abhängig, einer Nukleinsäure mit möglichst von den Experimentalbedingungen unabhängiger Expression. Für die Studien zur Sepsisdiagnostik wurden zwar grundsätzlich für miRNA-Quantifizierungen geeignete kleine nichtkodierende Nukleinsäuren wie U6 ausgewählt. Allerdings ist keiner der genutzten Housekeeper für ein septisches Milieu validiert. Es ist bekannt, dass unter dem Einfluss eines stark inflammatorisch geprägten Milieus auch sonst konstitutiv exprimierte Nukleinsäuren verändert sein können [105, 106]. Mit ungetesteten Housekeepern normalisierte Datensätze können daher nur als Screeningdaten verwendet werden und bedürfen einer weiteren experimentellen Bestätigung.

Um eine mögliche Nutzung von miRNAs in der Sepsisdiagnostik kritisch zu überprüfen, führten wir daher eine Validierungsstudie durch. Hierfür wurden zwölf Patienten mit gesicherter Sepsis und zwölf Patienten mit intensivmedizinischem Betreuungsbedarf ohne Sepsis auf unserer anäs-

thesiologisch geführten Intensivstation bei Aufnahme Blutproben entnommen. Als weitere Kontrollgruppe wurden zudem zwölf Blutspender des universitätseigenen Blutspendedienstes in die Studie eingeschlossen. Um einen direkten Vergleich mit etablierten Laborparametern zu ermöglichen, bestimmten wir bei jedem Patienten CRP und WBC sowie die Konzentrationen der Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α und IFN- γ im Serum. Zusätzlich wurden SOFA- und SAP-Score zum Zeitpunkt der Übernahme auf die Intensivstation dokumentiert.

Aufgrund der großen Zahl im menschlichen Serum nachweisbarer miRNAs war es notwendig eine Vorauswahl zu treffen. Hierfür nutzten wir ein zweistufiges Verfahren mit Literaturrecherche und einem experimentellen Screening mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung bei unserer eigenen Studienkohorte. Da zum Zeitpunkt der Untersuchung kein validierter Housekeeper für miRNA-Experimente in septischen Milieus vorlag, verwendeten wir die ddPCR als alternatives Bestimmungsverfahren. Hier ist keine Housekeeper-basierte Normalisierung erforderlich. Zusätzlich bietet die Methode den Vorteil einer absoluten Quantifizierung der miRNA-Kopienzahl im Serum. Hierdurch konnte eine hohe Qualität der Datensätze gewährleistet werden, insbesondere unter Berücksichtigung der besonderen Eignung für niedrigkonzentrierte miRNAs, wie es bei den vorliegenden Serumproben der Fall war [108].

Für die klassischen Laborparameter zeigten sich die Daten analog zu den zuvor publizierten Studien [34-37, 46, 47]. Die vorbekannten Beschränkungen bezüglich Sensitivität und Spezifität durch zahlreiche Störfaktoren [34-36, 50-54] führten auch in unserer Kohorte zu limitierter diagnostischer Genauigkeit. So konnte lediglich ein Trend, aber kein signifikanter Unterschied in der CRP-Konzentration zwischen septischen und nichtseptischen Intensivpatienten nachgewiesen werden. Ein statistisch gesicherter Unterschied konnte für den WBC bestimmt werden, sodass hier eine Abschätzung der diagnostischen Aussagekraft mittels Grenzwertoptimierungskurve (Receiver Operating Characteristic Curve, ROC-Kurve) durchgeführt wurde. Es ergab sich ein Flächenintegral (Area Under The Curve, AUC) von $0,78 \pm 0,11$. Dies zeigt eine hinreichende, aber nicht uneingeschränkte diagnostische Genauigkeit an. Auch für die untersuchten Zytokine ergab sich, wie in der Forschungsliteratur zuvor beschrieben, keine eindeutige Distinktionsfähigkeit zwischen den verschiedenen Studienkohorten [65-67]. Lediglich das in der klinischen Praxis etablierte IL-6 zeigte eine deutliche Abgrenzung der Patientenkohorten gegenüber den gesunden Blutspendern. Allerdings lag kein signifikanter Unterschied zwischen den nichtseptischen und septischen Patienten vor, daher führten wir keine ROC-Analyse durch.

Für die in die Untersuchung eingeschlossenen intensivmedizinischen Scoring-Systeme SOFA und SAP lagen keine Voruntersuchungen zur Eignung als diagnostische Parameter vor; sie wurden bisher vorrangig als prognostische Marker diskutiert [82-86]. Dennoch zeigten sich zwischen

septischen und nichtseptischen Patienten ein signifikanter Unterschied. Für den SOFA-Score ergab sich zudem eine geringfügige diagnostische Überlegenheit gegenüber dem WBC mit einer AUC von $0,80 \pm 0,09$.

Im Literaturscreening identifizierten wir sechs potenzielle miRNA-Sepsismarker (miR-26b-5p, miR-122-5p, miR-143-3p, miR-146a-5p, miR-193-3p und miR-223-3p), für die eine mögliche Eignung als diagnostischer Parameter beschrieben wurde [91-95]. Mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung von Serumproben der eigenen Studienkohorte konnten miR-486-3p und miR-486-5p als weitere Kandidaten vorselektiert werden. In der anschließenden Validierung wurde für miR-26b-5p und miR-193-3p ein signifikanter Unterschied in der Kopienzahl im Serum zwischen septischen und nichtseptischen Patienten nachgewiesen. Einschränkend ist dabei zu erwähnen, dass sich die Kopienzahl im Serum der gesunden Blutspender nicht signifikant von denen der Sepsispatienten unterschied. Hier zeigte sich für miR-193-3p zumindest ein Trend. In der ROC-Kurvenanalyse wurde für miR-26-3p eine AUC von $0,80 \pm 0,10$ ermittelt, welche vergleichbar mit dem Wert des SOFA-Score ist. Für miR-193-3p ergab sich eine etwas höhere diagnostische Genauigkeit von $0,85 \pm 0,08$. Für alle anderen betrachteten miRNAs konnte keine Eignung als diagnostischer Marker festgestellt werden.

Die erzielten Daten belegen, dass der Zugewinn an diagnostischer Genauigkeit durch Analyse von Serum-miRNAs eingeschränkt ist. Zwar zeigte miR-193-3p durchaus eine Verbesserung des AUC-Werts gegenüber dem WBC, dennoch ist dies mit Blick auf den fehlenden signifikanten Unterschied zwischen gesunden und septischen Probanden kritisch zu bewerten. Eine deutlichere Verbesserung der Aussagekraft konnte hingegen durch die Ergänzung des SOFA-Scores um die Serum-Kopienzahl von miR-193-3p erreicht werden. So stieg bei einem modifizierten SOFA-Score, bei dem für eine um zwei Standardabweichungen erhöhte Kopienzahl ein Punkt und pro weitere Standardabweichung ein weiterer Punkt auf den Bemessungswert addiert wurde, die AUC auf $0,91 \pm 0,06$. Diese Zunahme an diagnostischer Zuverlässigkeit ist als klinisch relevant einzustufen.

Aus den oben dargelegten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Kopienzahl einzelner miRNAs als alleiniges diagnostisches Kriterium für ein komplexes und individuell ausgeprägtes Syndrom, wie es die Sepsis darstellt, nicht geeignet ist. Die etablierten Scoring-Systeme, obgleich nicht für diagnostische Zwecke optimiert, konnten vergleichbare Genauigkeiten bei geringerem Aufwand der Bestimmung erreichen. Da bereits eine geringfügige Modifikation des SOFA-Scores eine relevante Verbesserung bewirkte, sollte zukünftig geprüft werden, ob ein umfassend neu gestalteter, auf die frühe Erkennung der Sepsis hin optimierter Score hier noch bestehendes Optimierungspotenzial ausschöpfen kann.

2.2 Housekeeper für miRNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR

Mit der ddPCR konnten wir für die oben beschriebene Studie eine sichere Quantifizierung der miRNAs auch ohne Housekeeper für septische Milieus durchführen. Allerdings ist die Verfügbarkeit dieser Methode eingeschränkt. Zudem sind die Kosten pro Bestimmung im Vergleich zur qRT-PCR erheblich höher. Um Folgeuntersuchungen zu miRNAs in septischen Milieus zu vereinfachen und eine mögliche klinische Nutzung perspektivisch zu ermöglichen, bedarf es also validierter Referenznukleinsäuren für miRNAs für Proben in inflammatorisch hochaktiven Milieus. Zu diesem Zweck führten wir eine experimentelle Studie zur Identifizierung geeigneter konstitutiv exprimierter Nukleinsäuren auf Basis von Zellkulturproben durch.

Ein idealer Housekeeper wird konstitutiv und unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert, zeigt also keinerlei inter- oder intraindividuelle Konzentrationsschwankungen. Zugleich sollten die biochemischen Eigenschaften vergleichbar mit der Ziel-Nukleinsäure sein, um Verzerrungen durch eine abweichende Effektivität der DNA-Polymerasen zu vermeiden [102, 103]. Daher beschränkten wir uns in der Studie auf miRNAs und schlossen andere, nicht-kodierende kleine Nukleinsäuren vorab aus.

Die *in vitro*-Untersuchungen erfolgten an Zelltypen, welche in der Pathophysiologie der Sepsis von Bedeutung sind: Endothelzellen und Makrophagen. Zum Einsatz kam die humane Telomerase-immortalisierte Endothelzelllinie TIME und die murine Makrophagenzelllinie RAW264.7. Um ein septisches Milieu zu simulieren wurden die Endothelzellen mit einem Zytokinmix (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) und die Makrophagen mit LPS aus *Escherichia coli* stimuliert. Zudem erfolgte eine Supplementierung mit den inflammationsmodulierenden ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure und Dokosahexaensäure. Anschließend führten wir eine Hochdurchsatz-Sequenzierung durch, um eine Vorauswahl potenzieller Housekeeper treffen zu können. Aufgrund ihrer stabilen Expression wurden für die humanen Endothelzellen let-7g-5p, let-7i-5p, miR-106b-3p, miR-127-3p und miR-151a-5p und für die murinen Makrophagen miR-10a-5p, miR-16-5p, miR-27b-3p, miR-103a-3p und miR-423-3p vorausgewählt. Es folgte ein zweistufiges Validierungsverfahren, bei dem sowohl qRT-PCT als auch ddPCR eingesetzt wurden. Hier konnten die Ergebnisse aus der Sequenzierung weitgehend bestätigt werden. Lediglich für miR-106b-3p und miR-10a-5p wurden stärkere Schwankungen in der Expression festgestellt, die gegen eine Verwendung als Referenznukleinsäure sprechen. Aufgrund ihrer Stabilität besonders geeignet zeigten sich miR-151a-5p für die Endothelzellen und miR-27b-3p und miR-103a-3p für die Makrophagen. Interessanterweise wurden die miRNAs miR-103a-3p und miR-151a-5p bereits als Referenzgene für andere Gewebe und Zellkulturen diskutiert; lediglich für miR-27b-3p liegt keine entsprechende Voruntersuchung vor [109-113]. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde eine Prüfung auf Plau-

sibilität mittels *in silico*-Analyse potenzieller genomischer Bindungsstellen und damit Regulationsmechanismen durchgeführt. Hierbei ergab sich für alle miRNAs eine nachgewiesene oder mögliche Interaktion mit zahlreichen biologischen Prozessen, mit Ausnahme von miR-423-3p aber keine Assoziationen zu Inflammationskaskaden. Es besteht somit kein mechanistischer Zusammenhang der postulierten Housekeeper-miRNAs zu biologischen Abläufen im Rahmen einer Entzündungsreaktion. Somit können die Ergebnisse der Studie als plausibel betrachtet werden.

Um eine hohe Sicherheit bei der Auswahl der Housekeeper zu gewährleisten, wurden in dieser Studie mehrere Methoden kombiniert. Die Ergebnisse der Hochdurchsatz-Sequenzierung wurden mit einem zweistufigen Validierungsverfahren geprüft und die anschließende *in silico*-Analyse konnte für die Housekeeper zudem eine Einbindung in Entzündungsreaktionen ausschließen. Der Umstand, dass keine gemeinsame Referenznukleinsäure für Endothelzellen und Makrophagen identifiziert werden konnte, bekräftigt jedoch die zuvor diskutierte Notwendigkeit einer gewebe- und milieuspezifischen Auswahl der Housekeeper [114, 115]. Bei Analysen von menschlichen Serumproben ist zu beachten, dass das hier vorzufindende miRNA-Profil vorrangig Ergebnis des gesamten Zellumsatzes ist und somit von zahlreichen Gewebefractionen beeinflusst wird. Insofern beschränkt sich die Anwendung der von uns benannten miRNA-Housekeeper auf entzündungsbezogene Zellkulturstudien an den entsprechenden Zelltypen; dennoch bilden sie eine Basis für weitere Untersuchungen an anderen Probenarten.

2.3 Ausblick

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die alleinige Bestimmung einzelner miRNAs für die Diagnostik der Sepsis keine genügende Sicherheit bieten kann; vielmehr scheinen zusammengesetzte Scoring-Systeme der komplexen Pathophysiologie eher gerecht zu werden. Der SOFA-Score - obwohl eigentlich für prognostische Zwecke entworfen und optimiert - zeigte bereits durch eine einfache Modifikation mit Ergänzung der miRNA miR-193-3p eine sehr hohe diagnostische Güte. Ein mit entsprechender Fokussierung auf diagnostische Aussagekraft entworfener Score aus mehreren Parametern kann demzufolge ein alternativer Lösungsansatz für das Biomarkerproblem darstellen. Hier könnte auch miR-193-3p eine Komponente sein, die zwar alleinstehend nicht die Kriterien für einen optimalen Biomarker erfüllt, aber zumindest eine gewisse Unterscheidung zwischen septischen und nichtseptischen Patienten abbildet. Für Folgestudien, die miRNAs als Komponente einschließen, stehen nun erstmalig Housekeeper zur Verfügung, die auch unter inflammatorischen Bedingungen stabil exprimiert werden. Auch wenn die Validierung für menschliche Serumproben noch ausstehend ist, konnte somit ein erster Schritt zur Verbesserung der Vergleichbarkeit von Untersuchungen zu miRNAs in septischen Umgebungen erreicht werden.

3 Literaturverzeichnis

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC (2016): The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock. *JAMA* 315:801-810.
2. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, International Sepsis Definitions C (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 29:530-538.
3. ACCP/SCCM (1992): Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20:864-874.
4. Lai NA, Kruger P (2011): The predictive ability of a weighted systemic inflammatory response syndrome score for microbiologically confirmed infection in hospitalised patients with suspected sepsis. *Crit Care Resusc* 13:146-150.
5. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K, International Forum of Acute Care T (2016): Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 193:259-272.
6. Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K (2016): Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int* 113:159-166.
7. Paoli CJ, Reynolds MA, Sinha M, Gitlin M, Crouser E (2018): Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States - An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level. *Crit Care Med* 46:1889-1897.
8. Adrie C, Alberti C, Chaix-Couturier C, Azoulay E, De Lassence A, Cohen Y, Meshaka P, Cheval C, Thuong M, Troche G, Garrouste-Orgeas M, Timsit JF (2005): Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost. *J Crit Care* 20:46-58.
9. Gotts JE, Matthay MA (2016): Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ* 353:1585-1605.
10. Takeuchi O, Akira S (2010): Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805-820.
11. Botos I, Liu L, Wang Y, Segal DM, Davies DR (2009): The toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex. *Biochim Biophys Acta* 1789:667-674.
12. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008): LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42:145-151.
13. Yang, Han Z, Oppenheim JJ (2017): Alarmins and immunity. *Immunol Rev* 280:41-56.
14. Buchholz BM, Billiar TR, Bauer AJ (2010): Dominant role of the MyD88-dependent signaling pathway in mediating early endotoxin-induced murine ileus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299:531-538.
15. O'Neill LA (2008): When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity* 29:12-20.
16. Alcaide P, Auerbach S, Luscinskas FW (2009): Neutrophil recruitment under shear flow: it's all about endothelial cell rings and gaps. *Microcirculation* 16:43-57.

17. Zhang JM, An J (2007): Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 45:27-37.
18. Newton K, Dixit VM (2012): Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:1-19.
19. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF (2017): Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol* 39:517-528.
20. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D (2013): Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13:862-874.
21. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, Tattevin P, Thomas R, Fauchet R, Drenou B (2002): Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 18:487-494.
22. Moine P, Abraham E (2004): Immunomodulation and sepsis: impact of the pathogen. *Shock* 22:297-308.
23. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascon GA, Hernandez G, Murray P, De Backer D, Workgroup AX (2016): The Endothelium in Sepsis. *Shock* 45:259-270.
24. Kakihana Y, Ito T, Nakahara M, Yamaguchi K, Yasuda T (2016): Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. *J Intensive Care* 4:22-32.
25. Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M (2015): Coagulopathy of Acute Sepsis. *Semin Thromb Hemost* 41:650-658.
26. Lever A, Mackenzie I (2007): Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ* 335:879-883.
27. Biondi EA, Mischler M, Jerardi KE, Statile AM, French J, Evans R, Lee V, Chen C, Asche C, Ren J, Shah SS, Pediatric Research in Inpatient Settings N (2014): Blood culture time to positivity in febrile infants with bacteremia. *JAMA Pediatr* 168:844-849.
28. Levy MM, Evans LE, Rhodes A (2018): The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med* 44:925-928.
29. Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, Friedrich ME, Iwashyna TJ, Phillips GS, Lemeshow S, Osborn T, Terry KM, Levy MM (2017): Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. *N Engl J Med* 376:2235-2244.
30. Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP (2007): Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed? *J Clin Microbiol* 45:3546-3548.
31. Cheng MP, Stenstrom R, Paquette K, Stabler SN, Akhter M, Davidson AC, Gavric M, Lawandi A, Jinah R, Saeed Z, Demir K, Huang K, Mahpour A, Shamatutu C, Caya C, Troquet JM, Clark G, Yansouni CP, Sweet D, Investigators F (2019): Blood Culture Results Before and After Antimicrobial Administration in Patients With Severe Manifestations of Sepsis: A Diagnostic Study. *Ann Intern Med* 171:547-554.
32. Coopersmith CM, De Backer D, Deutschman CS, Ferrer R, Lat I, Machado FR, Martin GS, Martin-Loeches I, Nunnally ME, Antonelli M, Evans LE, Hellman J, Jog S, Kesecioglu J, Levy MM, Rhodes A (2018): Surviving sepsis campaign: research priorities for sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 44:1400-1426.
33. Fan SL, Miller NS, Lee J, Remick DG (2016): Diagnosing sepsis - The role of laboratory medicine. *Clin Chim Acta* 460:203-210.
34. Kauh E, Mixson L, Malice MP, Mesens S, Ramael S, Burke J, Reynders T, Van Dyck K, Beals C, Rosenberg E, Ruddy M (2012): Prednisone affects

- inflammation, glucose tolerance, and bone turnover within hours of treatment in healthy individuals. *Eur J Endocrinol* 166:459-467.
35. Chabot-Richards DS, George TI (2014): Leukocytosis. *Int J Lab Hematol* 36:279-288.
 36. Riley LK, Rupert J (2015): Evaluation of Patients with Leukocytosis. *Am Fam Physician* 92:1004-1011.
 37. Wyczalkowska-Tomasik A, Czarkowska-Paczek B, Zielenkiewicz M, Paczek L (2016): Inflammatory Markers Change with Age, but do not Fall Beyond Reported Normal Ranges. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 64:249-254.
 38. Karon BS, Tolan NV, Wockenfus AM, Block DR, Baumann NA, Bryant SC, Clements CM (2017): Evaluation of lactate, white blood cell count, neutrophil count, procalcitonin and immature granulocyte count as biomarkers for sepsis in emergency department patients. *Clin Biochem* 50:956-958.
 39. Magrini L, Gagliano G, Travaglino F, Vetrone F, Marino R, Cardelli P, Salerno G, Di Somma S (2014): Comparison between white blood cell count, procalcitonin and C reactive protein as diagnostic and prognostic biomarkers of infection or sepsis in patients presenting to emergency department. *Clin Chem Lab Med* 52:1465-1472.
 40. Jekarl DW, Lee S, Kim M, Kim Y, Woo SH, Lee WJ (2019): Procalcitonin as a prognostic marker for sepsis based on SEPSIS-3. *J Clin Lab Anal* 33:e22996.
 41. Velissaris D, Pantzaris ND, Bountouris P, Gogos C (2018): Correlation between neutrophil-to-lymphocyte ratio and severity scores in septic patients upon hospital admission. A series of 50 patients. *Rom J Intern Med* 56:153-157.
 42. Kaushik R, Gupta M, Sharma M, Jash D, Jain N, Sinha N, Chaudhry A, Chaudhry D (2018): Diagnostic and Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Early and Late Phase of Sepsis. *Indian J Crit Care Med* 22:660-663.
 43. Pantzaris ND, Platanaki C, Pierrako C, Karamouzou V, Velissaris D (2018): Neutrophil-to-lymphocyte Ratio Relation to Sepsis Severity Scores and Inflammatory Biomarkers in Patients with Community-acquired Pneumonia: A Case Series. *J Transl Int Med* 6:43-46.
 44. Gabay C, Kushner I (1999): Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340:448-454.
 45. Wu Y, Potempa LA, El Kebir D, Filep JG (2015): C-reactive protein and inflammation: conformational changes affect function. *Biol Chem* 396:1181-1197.
 46. Pova P, Coelho L, Almeida E, Fernandes A, Mealha R, Moreira P, Sabino H (2005): C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* 11:101-108.
 47. Ugarte H, Silva E, Mercan D, De Mendonca A, Vincent JL (1999): Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med* 27:498-504.
 48. Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, Rungatscher A, Pavan R, Merlini A (2003): Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Crit Care Med* 31:1737-1741.
 49. Castelli GP, Pognani C, Cita M, Stuardi A, Sgarbi L, Paladini R (2006): Procalcitonin, C-reactive protein, white blood cells and SOFA score in ICU: diagnosis and monitoring of sepsis. *Minerva Anestesiol* 72:69-80.
 50. Aronson D, Bartha P, Zinder O, Kerner A, Markiewicz W, Avizohar O, Brook GJ, Levy Y (2004): Obesity is the major determinant of elevated C-reactive

- protein in subjects with the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:674-679.
51. Li K, Wei P, Qin Y, Wei Y (2017): Is C-reactive protein a marker of obstructive sleep apnea?: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 96:e6850.
 52. Allin KH, Nordestgaard BG (2011): Elevated C-reactive protein in the diagnosis, prognosis, and cause of cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48:155-170.
 53. Liu S, Ren J, Xia Q, Wu X, Han G, Ren H, Yan D, Wang G, Gu G, Li J (2013): Preliminary case-control study to evaluate diagnostic values of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in differentiating active Crohn's disease from intestinal lymphoma, intestinal tuberculosis and Behcet's syndrome. *Am J Med Sci* 346:467-472.
 54. Pieri G, Agarwal B, Burroughs AK (2014): C-reactive protein and bacterial infection in cirrhosis. *Ann Gastroenterol* 27:113-120.
 55. Becker KL, Nylen ES, White JC, Muller B, Snider RH, Jr. (2004): Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1512-1525.
 56. Muller B, Becker KL, Schachinger H, Rickenbacher PR, Huber PR, Zimmerli W, Ritz R (2000): Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med* 28:977-983.
 57. Morgenthaler NG, Struck J, Chancerelle Y, Weglohner W, Agay D, Bohuon C, Suarez-Domenech V, Bergmann A, Muller B (2003): Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection. *Horm Metab Res* 35:290-295.
 58. Russwurm S, Stonans I, Stonane E, Wiederhold M, Luber A, Zipfel PF, Deigner HP, Reinhart K (2001): Procalcitonin and CGRP-1 mRNA expression in various human tissues. *Shock* 16:109-112.
 59. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY (2006): Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 34:1996-2003.
 60. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P (2013): Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 13:426-435.
 61. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R (2013): Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm* 2013:165974.
 62. Huang M, Cai S, Su J (2019): The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* 20.
 63. Rugg C, Klose R, Hornung R, Innerhofer N, Bachler M, Schmid S, Fries D, Strohle M (2020): Hemoadsorption with CytoSorb in Septic Shock Reduces Catecholamine Requirements and In-Hospital Mortality: A Single-Center Retrospective 'Genetic' Matched Analysis. *Biomedicines* 8.
 64. Parameswaran N, Patial S (2010): Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20:87-103.
 65. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E (1993): Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 103:565-575.
 66. Thijs LG, Hack CE (1995): Time course of cytokine levels in sepsis. *Intensive Care Med* 21 Suppl 2:S258-263.

67. Jekarl DW, Kim JY, Ha JH, Lee S, Yoo J, Kim M, Kim Y (2019): Diagnosis and Prognosis of Sepsis Based on Use of Cytokines, Chemokines, and Growth Factors. *Dis Markers* 2019:1089107.
68. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163-189.
69. Lvovschi V, Arnaud L, Parizot C, Freund Y, Juillien G, Ghillani-Dalbin P, Bouberima M, Larsen M, Riou B, Gorochov G, Hausfater P (2011): Cytokine profiles in sepsis have limited relevance for stratifying patients in the emergency department: a prospective observational study. *PLoS One* 6:e28870.
70. Ter Horst R, Jaeger M, Smeekens SP, Oosting M, Swertz MA, Li Y, Kumar V, Diavatopoulos DA, Jansen AFM, Lemmers H, Toenhake-Dijkstra H, van Herwaarden AE, Janssen M, van der Molen RG, Joosten I, Sweep F, Smit JW, Netea-Maier RT, Koenders M, Xavier RJ, van der Meer JWM, Dinarello CA, Pavelka N, Wijmenga C, Notebaart RA, Joosten LAB, Netea MG (2016): Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses. *Cell* 167:1111-1124 e1113.
71. Dinarello CA, Bernheim HA (1981): Ability of human leukocytic pyrogen to stimulate brain prostaglandin synthesis in vitro. *J Neurochem* 37:702-708.
72. Shahkar L, Keshtkar A, Mirfazeli A, Ahani A, Roshandel G (2011): The Role of IL-6 for Predicting Neonatal Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iranian Journal of Pediatrics* 21:411-417.
73. Uciechowski P, Dempke WCM (2020): Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology* 98:131-137.
74. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S (2011): The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 1813:878-888.
75. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, Lamy M (1992): Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* 215:356-362.
76. Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT (2007): Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 11:R49.
77. Hou T, Huang D, Zeng R, Ye Z, Zhang Y (2015): Accuracy of serum interleukin (IL)-6 in sepsis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 8:15238-15245.
78. Song J, Park DW, Moon S, Cho HJ, Park JH, Seok H, Choi WS (2019): Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: a prospective controlled study according to the Sepsis-3 definitions. *BMC Infect Dis* 19:968.
79. Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van Damme J, Shenkin A (1990): Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci (Lond)* 79:161-165.
80. Van Oers MH, Van der Heyden AA, Aarden LA (1988): Interleukin 6 (IL-6) in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin Exp Immunol* 71:314-319.
81. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F (1993): A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270:2957-2963.
82. Capuzzo M, Valpondi V, Sgarbi A, Bortolazzi S, Pavoni V, Gilli G, Candini G, Gritti G, Alvisi R (2000): Validation of severity scoring systems SAPS II and APACHE II in a single-center population. *Intensive Care Med* 26:1779-1785.

83. Beck DH, Smith GB, Pappachan JV, Millar B (2003): External validation of the SAPS II, APACHE II and APACHE III prognostic models in South England: a multicentre study. *Intensive Care Med* 29:249-256.
84. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG (1996): The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22:707-710.
85. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Melot C, Vincent JL (2001): Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA* 286:1754-1758.
86. Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S (1998): Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 26:1793-1800.
87. Shruti K, Shrey K, Vibha R (2011): Micro RNAs: tiny sequences with enormous potential. *Biochem Biophys Res Commun* 407:445-449.
88. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014): miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research* 42:D68-D73.
89. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K (2010): The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56:1733-1741.
90. Cui M, Wang H, Yao X, Zhang D, Xie Y, Cui R, Zhang X (2019): Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Front Genet* 10:626.
91. Reithmair M, Buschmann D, Marte M, Kirchner B, Hagl D, Kaufmann I, Pfof M, Chouker A, Steinlein OK, Pfaffl MW, Schelling G (2017): Cellular and extracellular miRNAs are blood-compartment-specific diagnostic targets in sepsis. *J Cell Mol Med* 21:2403-2411.
92. Wang HJ, Zhang PJ, Chen WJ, Feng D, Jia YH, Xie LX (2012): Four serum microRNAs identified as diagnostic biomarkers of sepsis. *J Trauma Acute Care Surg* 73:850-854.
93. Han Y, Dai QC, Shen HL, Zhang XW (2016): Diagnostic value of elevated serum miRNA-143 levels in sepsis. *J Int Med Res* 44:875-881.
94. Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, Wan XJ, Zhu KM (2010): Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun* 394:184-188.
95. Wang L, Wang HC, Chen C, Zeng J, Wang Q, Zheng L, Yu HD (2013): Differential expression of plasma miR-146a in sepsis patients compared with non-sepsis-SIRS patients. *Exp Ther Med* 5:1101-1104.
96. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95-125.
97. Ohan NW, Heikkila JJ (1993): Reverse transcription-polymerase chain reaction: An overview of the technique and its applications. *Biotechnology Advances* 11:13-29.
98. Saarnio VK, Alaranta JM, Lahtinen TM (2021): Systematic study of SYBR green chromophore reveals major improvement with one heteroatom difference. *J Mater Chem B* 9:3484-3488.
99. Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.

100. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034.
101. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005): Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6:279-284.
102. Mase M, Grasso M, Avogaro L, D'Amato E, Tessarolo F, Graffigna A, Denti MA, Ravelli F (2017): Selection of reference genes is critical for miRNA expression analysis in human cardiac tissue. A focus on atrial fibrillation. *Sci Rep* 7:41127.
103. Chugh P, Dittmer DP (2012): Potential pitfalls in microRNA profiling. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3:601-616.
104. Sarveswaran J, Orsi NM, Cummings M, Homer-Vanniasinkam S, Burke D (2012): GAPDH: is it a reliable housekeeper gene to use in sepsis research? *Critical Care* 16:P107-P107.
105. Xiang M, Zeng Y, Yang R, Xu H, Chen Z, Zhong J, Xie H, Xu Y, Zeng X (2014): U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 454:210-214.
106. Benz F, Roderburg C, Vargas Cardenas D, Vucur M, Gautheron J, Koch A, Zimmermann H, Janssen J, Nieuwenhuijsen L, Luedde M, Frey N, Tacke F, Trautwein C, Luedde T (2013): U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Exp Mol Med* 45:e42.
107. 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.
108. Taylor SC, Laperriere G, Germain H (2017): Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Sci Rep* 7:2409.
109. Jacobsen KS, Nielsen KO, Winther TN, Glebe D, Pociot F, Høgh B (2016): Identification of valid reference genes for microRNA expression studies in a hepatitis B virus replicating liver cell line. *BMC Res Notes* 9:38.
110. Nilsen A, Jonsson M, Aarnes EK, Kristensen GB, Lyng H (2019): Reference MicroRNAs for RT-qPCR Assays in Cervical Cancer Patients and Their Application to Studies of HPV16 and Hypoxia Biomarkers. *Transl Oncol* 12:576-584.
111. Ratert N, Meyer HA, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Miller K, Kilic E, Erbersdobler A, Weikert S, Jung K (2012): Reference miRNAs for miRNAome analysis of urothelial carcinomas. *PLoS One* 7:e39309.
112. Lim QE, Zhou L, Ho YK, Wan G, Too HP (2011): snoU6 and 5S RNAs are not reliable miRNA reference genes in neuronal differentiation. *Neuroscience* 199:32-43.
113. Wotschovsky Z, Meyer HA, Jung M, Fendler A, Wagner I, Stephan C, Busch J, Erbersdobler A, Disch AC, Mollenkopf HJ, Jung K (2011): Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases. *Anal Biochem* 417:233-241.

114. Das MK, Andreassen R, Haugen TB, Furu K (2016): Identification of Endogenous Controls for Use in miRNA Quantification in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Genomics Proteomics* 13:63-68.
115. Ludwig N, Leidinger P, Becker K, Backes C, Fehlmann T, Pallasch C, Rheinheimer S, Meder B, Stahler C, Meese E, Keller A (2016): Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res* 44:3865-3877.

4 Thesen

1. Bisher konnte kein Biomarker identifiziert werden, der mit hoher Sensitivität und Spezifität als alleinstehender Parameter eine sichere Diagnosestellung bei septischen Patienten ermöglicht.
2. Die in der Literatur diskutierte Messung der Kopienzahl bestimmter miRNAs im Serum septischer Patienten ist als alleinstehendes diagnostisches Instrument den etablierten Parametern (WBC, CRP, PCT) und intensivmedizinischen Scoring-Systemen (SOFA-Score, SAP-Score) nicht überlegen.
3. Eine sichere und frühzeitige Diagnosestellung bei Sepsis kann derzeit nur über die Kombination mehrerer Parameter sowie der klinischen Befunde und Bildgebung gewährleistet werden.
4. Die Quantifizierung von miRNAs in einem septisch-inflammatorischen Milieu mittels qRT-PCR erfordert spezifisch für diese Fragestellungen und Zelltypen validierte Referenznukleinsäuren mit vergleichbarer Zahl an Basenpaaren; alternativ kann die ddPCR als Housekeeper-unabhängige Methode angewendet werden.
5. Für Untersuchungen an der humanen Endothelzelllinie TIME im septischen Milieu sind die miRNAs miR-151a-5p, let-7g-5p, let-7i-5p und miR-127-3p als Referenznukleinsäuren geeignet.
6. Für Untersuchungen an der murinen Makrophagenzelllinie RAW264.7 im septischen Milieu sind die miRNAs miR-16-5p, miR-27b-3p, miR-103a-3p und miR-423-3p als Referenznukleinsäuren geeignet.

5 Publikation I

Link F, Krohn K, Burgdorff AM, Christel A, Schumann J. (2020) Sepsis Diagnostics: Intensive Care Scoring Systems Superior to MicroRNA Biomarker Testing.

Journal: Diagnostics (Impact Factor 2021/2022: 3,24)

DOI: 10.3390/diagnostics10090701

Zusammenfassung:

Um eine Verzögerung des Behandlungsbeginns von Sepsispatienten zu vermeiden, bedarf es sensibler und spezifischer diagnostischer Marker, die ein schnelles Erkennen septischer Krankheitsverläufe ermöglichen. Entsprechend werden verschiedene Laborparameter und Scoring-Systeme diskutiert, die in zahlreichen Studien separat, aber selten direkt vergleichend untersucht wurden. Insbesondere miRNAs wurden zuletzt in einigen Publikationen als potenzielle diagnostische Instrumente vorgeschlagen. Aufgrund der hohen Varianz der bisher vorliegenden Ergebnisse war die Eignung im Bereich der Sepsisdiagnostik jedoch unklar. Ziel dieser Untersuchung war daher der strukturierte Vergleich klassischer diagnostischer Parameter mit ausgewählten miRNAs erhoben für dieselbe Patientenkohorte. Wir akquirierten für die Studie neben Sepsispatienten auch nichtseptische Intensivpatienten und Blutspender als gesunde Kontrollgruppe. Erhoben wurden klassische Inflammationsmarker, die intensivmedizinischen Scoring-Systeme SOFA-Score und SAP-Score, die Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IFN- γ sowie einige vorausgewählte miRNAs. Insgesamt konnte für keinen der untersuchten Parameter eine herausragende diagnostische Eignung festgestellt werden; die in Vorstudien beschriebene Eignung bestimmter miRNAs als Biomarker bestätigte sich nicht. Es zeigt sich, dass kein einzelner Parameter eine sichere Diagnostik gewährleisten kann. Vielmehr ist es notwendig, verschiedene Parameter im Kontext der klinischen Präsentation des Patienten zu interpretieren.

Darstellung der Eigenleistung:

Auswertung der Fallberichte, Literaturrecherche, Zytokin-Quantifizierung mittels ELISA, RNA-Präparation, miRNA-Quantifizierung mittels ddPCR, statistische Auswertung der Datensätze, Mitverfassen des Artikeltexts.

Sepsis Diagnostics: Intensive Care Scoring Systems Superior to MicroRNA Biomarker Testing

Fabian Link ¹, Knut Krohn ², Anna-Maria Burgdorff ¹, Annett Christel ¹ and Julia Schumann ^{1,*}

¹ Clinic for Anesthesiology and Surgical Intensive Care, University Hospital Halle (Saale), 06120 Halle, Germany; fabian.link2@student.uni-halle.de (F.L.); am.burgdorff@gmail.com (A.-M.B.); annett.christel@uk-halle.de (A.C.)

² Core Unit DNA Technologies, Medical Faculty, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany; Knut.Krohn@medizin.uni-leipzig.de

* Correspondence: julia.schumann@uk-halle.de; Tel.: +49-(345)-557-1776; Fax: +49-(345)-557-1781

Received: 3 September 2020; Accepted: 14 September 2020; Published: 16 September 2020

Abstract: Sepsis represents a serious medical problem accounting for numerous deaths of critically ill patients in intensive care units (ICUs). An early, sensitive, and specific diagnosis is considered a key element for improving the outcome of sepsis patients. In addition to classical laboratory markers, ICU scoring systems and serum miRNAs are discussed as potential sepsis biomarkers. In the present prospective observational study, the suitability of miRNAs in sepsis diagnosis was tested based on proper validated and normalized data (i.e., absolute quantification by means of Droplet Digital PCR (ddPCR)) in direct comparison to classical sepsis markers and ICU scores within the same patient cohort. Therefore, blood samples of septic intensive care patients ($n = 12$) taken at day of admission at ICU were compared to non-septic intensive care patients ($n = 12$) and a healthy control group ($n = 12$). Our analysis indicates that all tested biomarkers have only a moderate informative power and do not allow an unequivocal differentiation between septic and non-septic ICU patients. In conclusion, there is no standalone laboratory parameter that enables a reliable diagnosis of sepsis. miRNAs are not superior to classical parameters in this respect. It seems recommendable to measure multiple parameters and scores and to interpret them with regard to the clinical presentation.

Keywords: sepsis; inflammation; biomarker; sequential organ failure assessment (SOFA) score; miRNA; cytokines

1. Introduction

Sepsis represents a serious medical problem that affects about two percent of hospital admissions in developed countries [1] and remains one of the leading causes of death in critically ill patients in intensive care units (ICUs) [2]. To improve the outcome of septic patients, therapy has to start as soon as possible [3], which demands a quick and precise diagnosis. Consequently, the Surviving Sepsis Campaign declared the verification of rapid diagnostic tests as a sepsis research priority [4]. At present various biomarkers have been assessed for their suitability in sepsis diagnostics, while few could be established in clinical practice [5]. The most commonly used markers encompass white blood cell count (WBC) as well as the acute phase proteins C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) [6]. A major disadvantage of these inflammation parameters is their limited specificity since they do not allow for an unambiguous distinction between septic and other critically ill patients [5–7]. Further inflammatory mediators involved in sepsis pathogenesis are the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), and the interleukins IL-1 β and IL-6 [8,9]. Cytokine concentration in the serum of septic patients, though, was

found to be very variable and strongly dependent on the time of blood collection which restricts the diagnostic usability [8,10–16]. Indeed, the only cytokine commonly used in clinical practice for sepsis diagnostics is IL-6 in neonatology [17]. For outcome prediction of septic patients in ICUs, various clinical parameters are combined into complex scores. The sequential organ failure assessment (SOFA) score and the simplified acute physiology score II (SAPS II) are well established with respect to a high prognostic significance [18,19]. However, while there are studies on the accuracy of outcome prediction, the suitability for initial diagnostics in sepsis has hardly been investigated. Recently, serum-circulating miRNAs were discussed as new sepsis biomarkers [20–32]. miRNAs are small, single-stranded, and non-coding nucleotides involved in the regulation of gene expression [33]. According to miRBase (release 22.1) there are 1917 precursors and 2654 mature miRNAs in humans [34]. miRNAs are present in all body fluids and can, therefore, be easily analyzed in a patient's blood sample. In the medical field of oncology certain miRNAs have already been confirmed as biomarkers for specific tumor entities [35]. With regard to sepsis diagnostics, the situation is less clear. There are scientific publications proposing certain miRNAs as sepsis biomarkers [20,23,26,31,32], but study results are characterized by great discrepancies with respect to the recommended miRNAs. These conflicting data may be due to insufficient normalization. In fact, the majority of studies are characterized by a lack of validity as they merely use screening data or on qPCR data normalized using inappropriate housekeepers like U6 snRNA [36,37]. As a consequence, no miRNA marker has been established as a sepsis biomarker in clinical practice so far [38–40]. Against this background, the aim of the present study was to evaluate the suitability of miRNAs in sepsis diagnostics based on proper validated and normalized data in direct comparison to classical sepsis markers and ICU scores within the same patient cohort.

To avoid bias caused by improper normalization, miRNA quantification was performed by means of ddPCR. In this method, samples with a calibrated nucleic acid concentration are dispersed in droplets before polymerase chain reaction starts [41]. After thermocycling, the fluorescence signal is read for all droplets individually [41]. Data processing is based on the Poisson distribution to correct for variant allocation of nucleotides in droplets [41]. Previous studies have shown high accuracy and reliability of data for investigations on miRNAs [42,43]. Thus, the strength of this study is the sophisticated implementation of ddPCR, which allows for an absolute quantification of miRNAs thereby bypassing the critical issue of selecting an appropriate normalization model.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics

This prospective observational study was performed at the University Hospital Halle (Saale, Germany). The study protocol was approved by the responsible Ethics Committee of the Medical Faculty of the Martin Luther University Halle-Wittenberg without any ethical objections to the conduct of the study (approval code: 2016-24, approval date: 20. April 2016). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. In consultation with the ethics committee, a group size of $n = 12$ was defined per study group in order to evaluate whether the concept of using miRNAs as sepsis biomarkers is likely to yield results. Only in case of a positive evaluation based on this number of included patients and volunteers the study protocol provided for a second step in terms of an expansion of the group size to $n = 100$ per group. All study participants or their next of kin gave written informed consent.

2.2. Study Population and Sample Collection

Three study groups were investigated: healthy control (HC) group, septic intensive care (SIC) group, and non-septic intensive care (NIC) group. The HC group represented blood donors matching the requirement profile of the hospital's blood donation service. SIC and NIC groups were recruited at the ICU of the Clinic for Anesthesiology and Surgical Intensive Care, University Hospital Halle (Saale, Germany). Enrolment took place from August 2016 till February 2018. Exclusion criteria were age under 18 years, simultaneous or previous (within 30 days prior to study

inclusion) participation in a clinical trial, lack of consent, pregnancy, AIDS, palliative situation, immunosuppressive therapy, active gastrointestinal bleeding, or the need for immediate surgery. Allocation to the SIC group was based on the Sepsis-3 criteria with evidence of severe infection and recurrent organ failure via clinical, radiological, and laboratory findings [44]. ICU patients with signs of recurrent organ failure and pathological leucocyte count or CRP values not fulfilling Sepsis-3 criteria were assigned to the NIC group. The determination of the laboratory parameters and the classification in the corresponding reference range was performed by the central laboratory of the University Hospital.

Blood samples were taken at day of admission using serum separating tubes (S-Monovette, Sarstedt, Nümbrecht, Germany). According to the study protocol, blood sampling for subsequent miRNA analysis was permitted within the first 24 h after admission to ICU concerning both the standardized procedures of initial sampling in intensive care patients for diagnostic purposes and time dependent variations of miRNA expressions. Blood samples were centrifuged immediately at $1400\times g$ for 15 min. Serum was taken off and stored at -80°C .

Clinical and epidemiological parameters of the SIC and NIC patients (age, gender, main diagnosis, routine blood test results, results of blood culture, SOFA score, SAPS II, and 28-day mortality) were collected in case reports.

2.3. Literature Research

Electronic searches were performed on 1 March 2018 in the following databases: (i) PubMed/MEDLINE, and (ii) Web of Science. Search terms included “sepsis”, “miRNA*”, “biomarker*” combined with the Boolean operator “AND”. An abstract screening was performed to identify eligible articles based on following exclusion criteria: no original research article, no human model, participant’s age < 18 years, reference to sepsis-related secondary diseases, no qPCR validated data. Remaining articles were assessed in full text regarding miRNA-based sepsis biomarkers.

2.4. RNA Isolation

Total RNA was isolated using TriFast FL (VWR/Peqlab, Erlangen, Germany) following the manufacturer’s standard protocol for serum extraction. To purify samples, a routine precipitation of RNA was performed based on Ambion® molecular biology grade 5 M ammonium acetate solution (Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Germany). Concentration and quality of the isolated RNA was determined using the NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Germany). An absorbance quotient $A_{260}/A_{280} > 1.8$ was considered appropriate for further procedures.

2.5. Deep Sequencing and Analysis of Deep Sequencing Data

miRNA expression was analyzed by next generation sequencing (NGS) in the Core Unit DNA, Medical Faculty, Leipzig University by means of an Illumina HiScan sequencer (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) as previously described [45]. Samples were processed using the TruSeq Small RNA Prep kit v2 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) following the manufacturer’s standard protocol. Size restriction (140–165 bp), purification, and quantification of barcoded libraries were performed using the library quantification kit, Illumina/Universal (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA). For cluster generation up to 10 libraries per lane were factored using an Illumina cBot. An Illumina HighScanSQ sequencer was used to perform 50 bp sequencing based on version 3 chemistry and flowcell following the manufacturer’s standard protocol.

For deep sequencing data analysis, the adapter sequences were removed from raw sequences using Cutadapt software, version 1.9.1. To verify that small RNAs other than mature miRNAs are filtered out from the data only sequences 15–27 bases long were analyzed. These reads were aligned to the human genome (GRCh38: NCBI_Assembly:GCA_000001405.15) as well as mature sequences of miRBase v21 using the bowtie aligner. An error rate of 1 nt per mature miRNA sequence was

accepted. For data compression to bam format, Samtools were used. Mapped reads count was determined using the R/Bioconductor programming environment by application of the ShortRead library. Sequence analysis after mapping against mature sequences of miRBase v21 is not affected by counts for other small RNAs (e.g., rRNA, tRNA fragments) because these sequences are not present in the reference sequences. For mapping against the whole genome reference rRNA or tRNA fragments are usually below 1–2% in the 15–27 bp fraction. Reads that map to their respective loci were removed before analysis using genome coordinates. Normalization of data was performed by independent application of the DESeq 2 and the TMM (EdgeR) algorithm. NGS was performed for four individuals of every study group.

2.6. Droplet Digital PCR

Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to standard protocol. To avoid bias due to incorrect normalization, expression analysis of the human miRNAs miR-26b-5p, miR-122-5p, miR-143-3p, miR-146a-5p, miR-193-3p, miR-223-3p, miR-486-3p, and miR-486-5p was performed by means of the housekeeper-independent Droplet Digital PCR technology (BioRad, Munich, Germany) following the manufacturer's instructions. Suitable miRCURY LNA miRNA PCR assay primers (QIAGEN, Hilden, Germany) and ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany) were used. PCR reaction was performed in a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Munich, Germany). Measurement of positive droplets per μL sample was performed on a QX200 ddPCR Droplet Reader (Bio-Rad, Munich, Germany). Based on the droplet count and according to Poisson Distribution, absolute nucleic acid copy count was calculated. Data output was converted into nucleic acid copy count per ng RNA. ddPCR reaction was performed in duplicates for each individual analyzed.

2.7. ELISA

Quantification of the cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IFN- γ in the serum was performed using suitable human ELISA kits (Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Germany) following the manufacturer's standard protocol. Absorbance was determined on an EnSpire multimode plate reader (PerkinElmer, Rodgau, Germany) at 450 nm wavelength. ELISA was performed in duplicates for each individual analyzed.

2.8. Statistical Analysis

If not stated otherwise data are shown as median $\pm$ interquartile range (IQR). To identify significant differences, a nonparametric Mann–Whitney U test was performed in two group comparisons and a nonparametric Kruskal–Wallis one-way analysis of variances by ranks followed by Dunn's corrected multiple testing was used in three group comparisons. Categorical variables were compared using the χ^2 test. The statistical analysis was carried out by means of the program GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). In all cases, $p < 0.05$ was assumed to indicate significant differences.

3. Results

3.1. Characteristics of the Study Population

This study included 36 study participants enrolled in three groups: healthy control (HC) group ($n = 12$), septic intensive care (SIC) group ($n = 12$), and non-septic intensive care (NIC) group ($n = 12$). Epidemiological, clinical, and routine laboratory parameters of the study population are shown in Table 1. Overall median age was 58 (IQR 73–47). While SIC and NIC group were quite comparable in age ($p = 0.322$), the HC group was significantly younger ($p < 0.01$). This was to be expected due to the requirement profile of the blood donation service. The gender distribution was quite balanced ($p = 0.66$) between all groups. Also, there were no significant differences between SIC and NIC group regarding routine laboratory parameters (hemoglobin, hematocrit, erythrocyte or thrombocyte cell

count, creatinine, bilirubin). A major difference, however, was seen regarding the 28-day mortality rate. In comparison to the NIC group, the number of deaths in the SIC group was twice as high (31% versus 17%). Of note, for the vast majority of SIC patients (11 out of 12 enrolled patients) blood cultures were positive, which underscores the validity of data collected. The remaining patient had clinical evidence of infection with extensive endocarditis. Sepsis was mainly caused by urogenital infection (42%), followed by intestinal perforation (25%), and endocarditis (17%).

Table 1. Epidemiological, clinical, and routine laboratory parameters of the study participants at admission.

Characteristic	HC Group <i>n</i> = 12	SIC Group <i>n</i> = 12	NIC Group <i>n</i> = 12
Age (years)	44.1 ± 19.5	61.5 (73–45)	72 (77.5–55.5)
Sex, male (%)	60	66	50
28-day mortality (%)	-	33	16.7
BMI	-	22.9 (26.5–21.0)	24.1 (28.7–23.1)
Hemoglobin (mmol/L)	-	5.9 (6.2–5.3)	6.4 (6.9–5.2)
Hematocrit (%)	-	27.0 (28.8–27.0)	0.28 (0.33–0.24)
Erythrocytes (10 ¹² /L)	-	3.2 (3.6–3.0)	3.2 (3.8–2.8)
Leukocytes (10 ⁹ /L)	-	17.7 (31.2–12.5)	10.1 (12.3–9.1)
Thrombocytes (10 ⁹ /L)	-	134.5 (307.0–100.0)	200.5 (262.0–142.5)
Creatinine (μmol/L)	-	101.5 (274–61)	101 (141–61)
Bilirubin (μmol/L)	-	12.2 (29.6–12.2)	8.5 (15.8–6.9)
SOFA score	-	7.5 (10.8–5.3)	4.5 (6.0–1.5)
SAPS II score	-	45.5 (51.5–38.0)	31.5 (39.8–23.0)

Data are presented as median (IQR); the asterisk denotes significance ($p < 0.05$) versus the HC group. BMI, body mass index; HC, healthy control; IQR, interquartile range; NIC, non-septic intensive care; SAPS II, simplified acute physiology score II; SIC, septic intensive care; SOFA, sequential organ failure assessment.

3.2. Classical Sepsis Markers and Scores

ICU patients were routinely tested for WBC as well as serum levels of CRP at day of admission. In addition, the SOFA score and the SAPS II were determined immediately after hospitalization in intensive care. Compared to the NIC group, WBC was significantly elevated in SIC patients (1.9-fold), while CRP showed a non-significant trend (Figure 1). Significant differences between the SIC group and the NIC group were also found with respect to the established sepsis scores SOFA and SAPS II (Figure 1). Compared to the NIC group, SIC patients were characterized by increased levels of both the SOFA score (1.9-fold) and the SAPS II (1.4-fold).

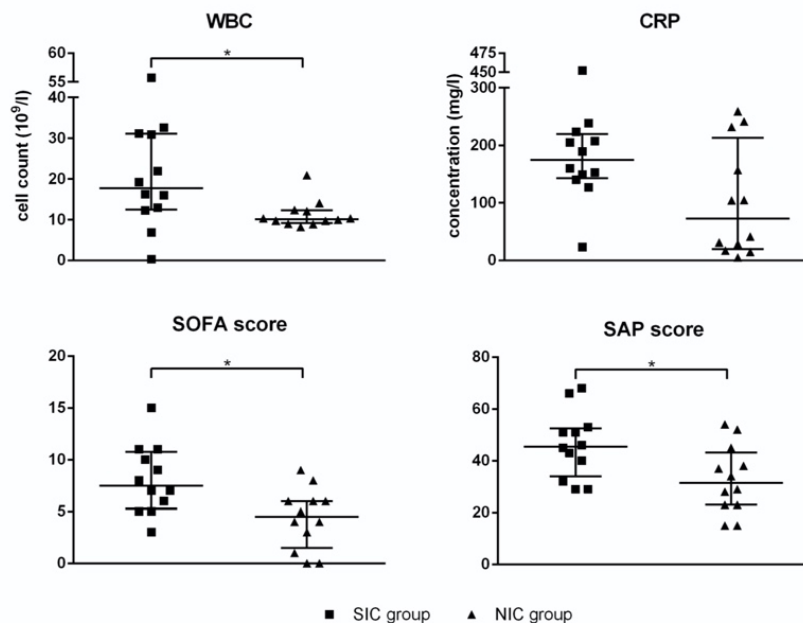


Figure 1. White blood cell count (WBC), serum level of C-reactive protein (CRP), the sequential organ failure assessment (SOFA) score, and the simplified acute physiology (SAP) score II were determined for every patient enrolled in the septic intensive care (SIC) and the non-septic intensive care (NIC) group. The blood sample was taken immediately after admission to the intensive care unit (ICU). Data are presented as median $\pm$ interquartile range (IQR; $n = 12$); the asterisk denotes a significant ($p < 0.05$) group difference.

3.3. Cytokines

Serum levels of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , and IL-6 were measured using highly sensitive ELISA assays. Remarkably, the concentrations of TNF- α and IFN- γ were found to be below the assay's detection limit for the majority of tested individuals independent of group assignment (TNF- α detection limit of 0.5 pg/mL exceeded by only 11 of 36 study participants; IFN- γ detection limit of 0.24 pg/mL exceeded by only 15 of 36 study participants). The concentration of IL-1 β could be determined for 19 of 36 study participants, the statistical analysis showed no significant differences between groups (Figure 2). IL-6 could be measured for all test subjects except for four healthy test persons (Figure 2). Compared to the HC group, the serum level of IL-6 was significantly increased in both SIC and NIC patients. However, the group comparison between SIC and NIC patients revealed no significant differences, which questions the suitability of these parameter as specific sepsis marker.

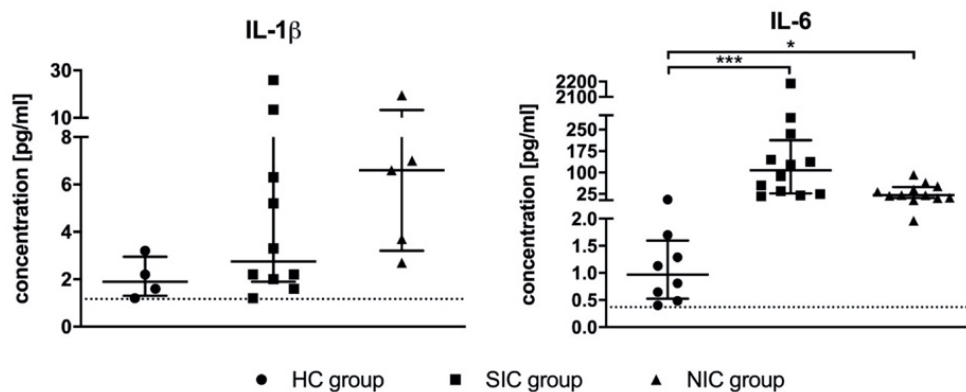


Figure 2. Serum concentrations of the pro-inflammatory cytokines interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 6 (IL-6) were determined by means of suitable ELISA kits. The blood sample was taken immediately after admission to the intensive care unit (ICU). Data are presented as median $\pm$ IQR; the asterisk denotes a significant group difference (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

3.4. miRNAs

3.4.1. Screening

Two independent screening approaches were used to identify potential miRNA-based sepsis markers. First, a structured web search for scientific publications dealing with this topic was performed. Details of the literature search are shown in Figure 3. Second, an NGS (next generation sequencing) profiling of serum miRNAs was conducted based on four representative individuals of each study group.

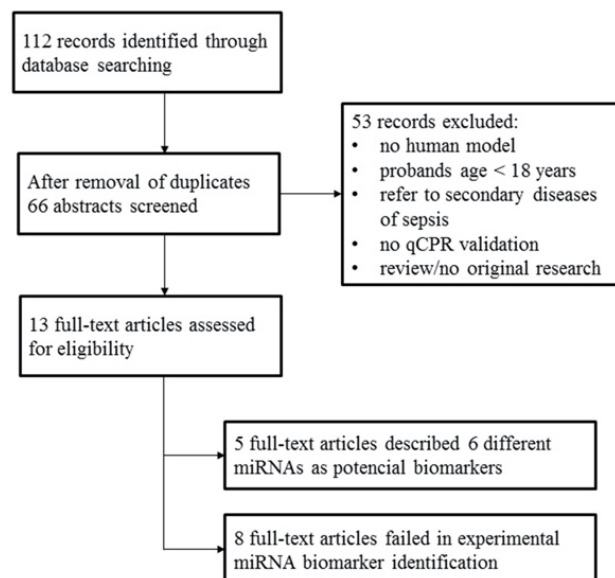


Figure 3. Literature research was performed on 1 March 2018 utilizing the databases PubMed/MEDLINE and Web of Science by means of the search terms “sepsis”, “miRNA*”, “biomarker*” combined with the Boolean operator “AND”.

The literature search resulted in 13 full-text original research articles; eight of these described a failed experimental validation of a miRNA-based sepsis marker. Nevertheless, we identified five full-text articles that proposed particular miRNAs as potential sepsis markers (Table 2). These studies were characterized by a remarkable lack of agreement on the suggested miRNA-based markers. In summary, the following six miRNAs were suggested: miR-26b-5p [32], miR-122-5p [23], miR-143-3p [31], miR-146a-5p [20,26], miR-193-3p [26], and miR-223-3p [20,26].

Table 2. miRNAs proposed in literature as sepsis markers.

Proposed Biomarker	Housekeeper Used	Article DOI
miR-26b-5p	Mean of hsa-miR-185-5p and hsa-miR-25-3p	10.1111/jcmm.13162
miR-122-5p	U6	10.1097/TA.0b013e31825a7560
miR-143-3p	U6	10.1177/0300060516645003
miR-146a-5p	Spike-in (mmu-miR-295)	10.1016/j.bbrc.2010.02.145
	U6	10.3892/etm.2013.937
miR-193-3p	U6	10.1097/TA.0b013e31825a7560
miR-223-3p	Spike-in (mmu-miR-295)	10.1016/j.bbrc.2010.02.145
	U6	10.1097/TA.0b013e31825a7560

NGS analysis resulted in the detection of 256 miRNAs with a great variability in abundance. Selection of potential miRNA-based sepsis markers was linked to the following criteria: (i) high abundance (>100 reads in average); and (ii) effect strength of Cohen's D > 0.8, which is considered a large effect size [46]. The only miRNAs fulfilling both criteria were miR-486-3p and miR-486-5p.

3.4.2. Validation

To validate the potential miRNA-based sepsis markers identified in the previous screening process a housekeeping gene independent absolute quantification by means of ddPCR was performed. All eight miRNAs identified during screening were included into the validation process.

Intra-group validity was assessed by means of the coefficient of variation (CV) for every miRNA investigated (please see Supplementary Materials Table S1). All miRNAs showed a high variability within the healthy control group, complicating the specification of a threshold value. Copy counts also fluctuated strongly in the SIC group and the NIC group, which suggests that there may be further interfering factors.

For estimation of the influence of sepsis on the particular miRNA, expression changes were calculated for each individual SIC and NIC patient as fold changes compared to the HC group and were visualized in a scaled heat map (Figure 4).

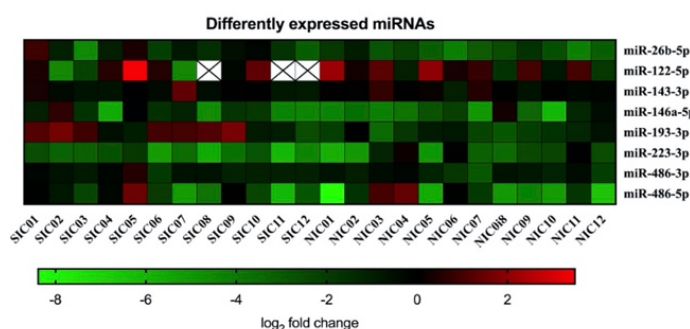


Figure 4. Serum copy counts of miRNAs miR-26b-5p, miR-122-5p, miR-143-3p, miR-146a-5p, miR-193-3p, miR-223-3p, miR-486-3p, and miR-486-5p were determined in septic intensive care patients (SIC) and non-septic intensive care patients (NIC) by means of the Droplet Digital PCR technology. Data are presented for each individual patient as log₂ fold change of miRNA compared to the healthy control group.

The resulting picture does not show clustering of miRNA expression levels, which prevents a correct classification of patients as septic or non-septic on this basis. Comparing the SIC group, NIC group, and HC group, four miRNAs (miR-122-5p, miR-143-3p, miR-486-3p, miR-486-5p) showed no significant group differences at all (Figure 5). For miR-146a-5p, a significant group difference was found between the HC group and the NIC group (Figure 5). Expression of miR-223-3p was found to be diminished in SIC patients compared to the HC group (Figure 5). However, the group comparison between SIC and NIC patients revealed almost equal expression levels of both miR-146a-5p and miR-223-3p, which makes these miRNAs unsuitable for the identification of sepsis patients on ICUs (Figure 5). The only miRNAs with demonstrably significant differences in expression between SIC and NIC patients were miR-26b-5p and miR-193-3p ($p < 0.05$; Figure 5). Nevertheless, suitability of these miRNAs as sepsis markers is limited by the fact that there was no clear distinction between healthy and critically ill patients (either septic or non-septic; Figure 5).

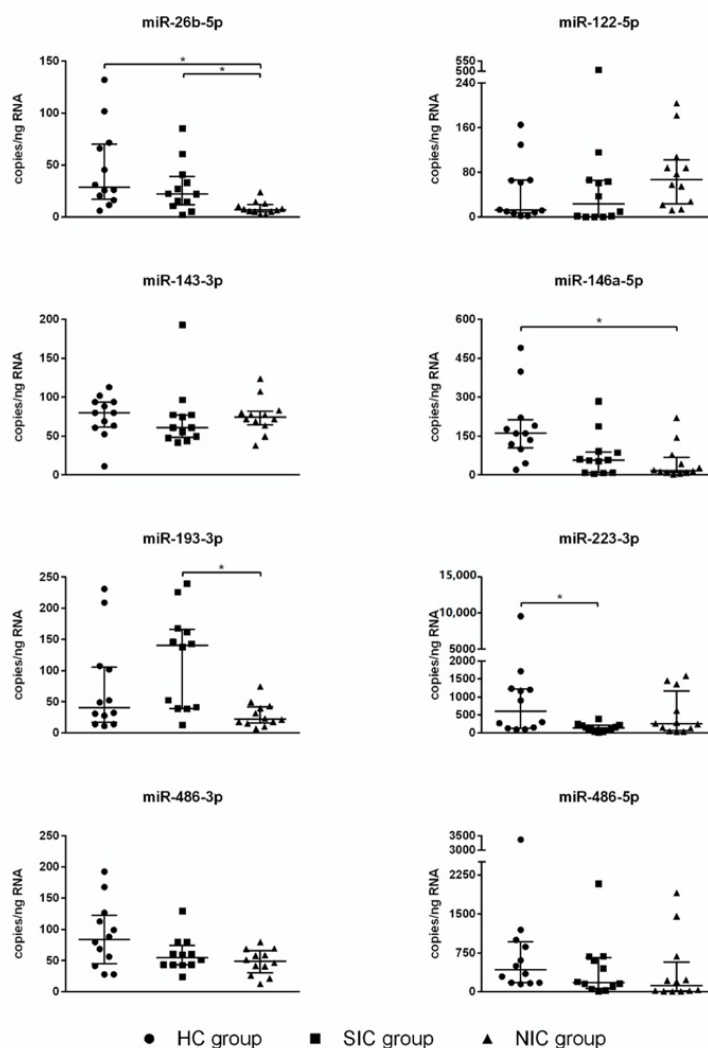


Figure 5. Serum copy counts of the miRNAs miR-26b-5p, miR-122-5p, miR-143-3p, miR-146a-5p, miR-193-3p, miR-223-3p, miR-486-3p, and miR-486-5p were determined by means of the Droplet Digital PCR technology. The blood sample was taken immediately after admission to the intensive care unit (ICU). Data are presented as median $\pm$ IQR ($n = 12$, $n = 2$); the asterisk denotes a significant ($p < 0.05$) group difference.

3.5. Diagnostic Capability

In order to estimate the diagnostic capability of the tested sepsis markers that enabled a statistically valid differentiation between SIC and NIC patients (i.e., WBC, SOFA score, SAPS II, miR-26b-5p, miR-193-3p) a ROC curve analysis was performed (Figure 6). The calculated AUC for WBC was 0.78 ± 0.11 (95% CI: 0.56–0.99; $p = 0.02$). The sepsis scores, which have so far been used primarily for prognostic purposes, reached comparable values of 0.80 ± 0.09 (95% CI: 0.62–0.98; $p = 0.01$; SOFA score) and 0.76 ± 0.10 (95% CI: 0.56–0.96; $p = 0.03$; SAP score II). The miRNA miR-26b-5p showed a similar diagnostic capability reaching an AUC of 0.80 ± 0.10 (95% CI: 0.60–0.99; $p = 0.01$). A slightly better suitability to differentiate between the SIC and NIC groups was indicated for miR-193-3p reaching an AUC of 0.85 ± 0.08 (95% CI: 0.69–1.00; $p = 0.004$).

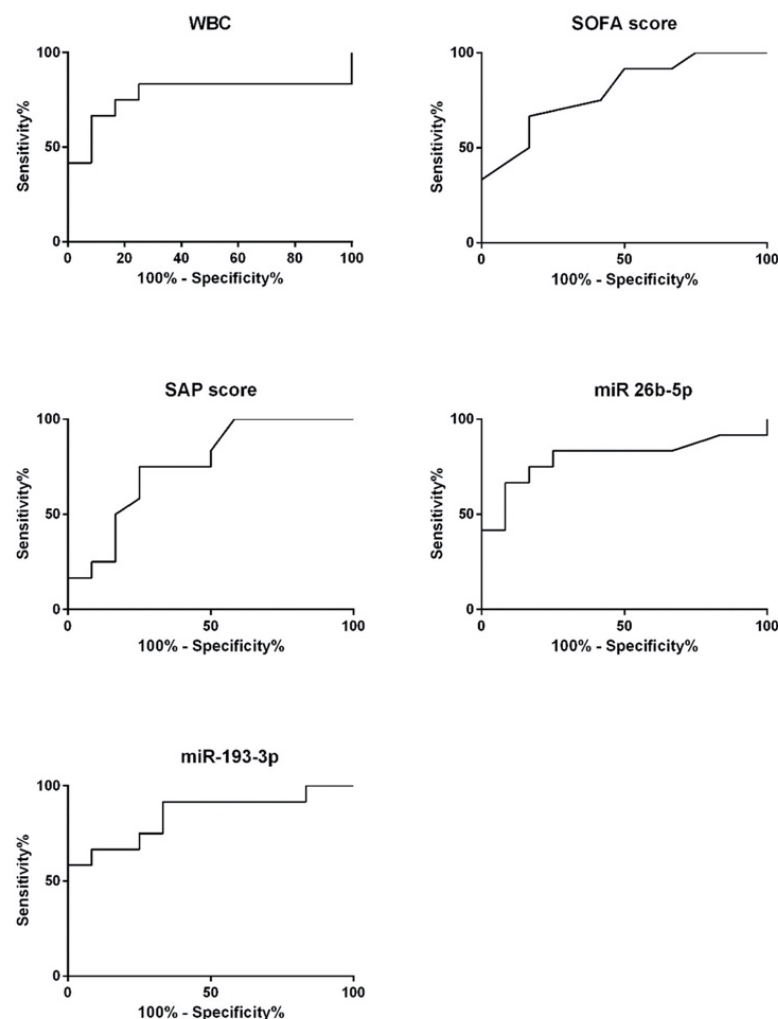


Figure 6. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed on all parameters that showed significant group differences between the septic intensive care (SIC; $n = 12$, $n = 2$) and the non-septic intensive care (NIC; $n = 12$, $n = 2$) groups.

To test whether the integration of miRNA quantity as an additional parameter could optimize diagnostic informative power, we modified the calculation of the SOFA score. Based on the mean and standard deviation of miR-193-3p copy counts in the NIC group, we added one score point for a

number of copies exceeding two standard deviations and up to four points for each further standard deviation above. Direct comparison of the SOFA score and modified SOFA score is displayed in supplementary Figure 1. The AUC for the modified SOFA score was 0.91 ± 0.06 (95% CI: 0.80–1.00; $p = 0.0007$), which is a relevant improvement compared to the unmodified scoring system.

4. Discussion

A key element for improving the outcome of sepsis patients—who despite all developments in intensive care medicine continue to show a high mortality rate—is the identification of biomarkers that allow an early, sensitive, and specific diagnosis [44]. A particular challenge is the differentiation from other patients in critical care who suffer, for instance, from burn injuries or polytrauma. So far, numerous studies have tested various parameters, such as acute phase proteins, cytokines, and different scoring systems [47,48]. However, no universally accepted standard in clinical practice could be established with regard to the ambiguous study situation [4]. The classical laboratory parameters including WBC, CRP, and cytokines are widely used in sepsis diagnostics. Advantages are broad availability and relatively low costs of determination [6]. Yet it is known that many other factors besides sepsis have an influence on the serum concentration of these markers, e.g., hepatic function, immunosuppression, antibiotic therapy, or time of blood sampling [5,6]. The low specificity of the classical laboratory parameters is also reflected by the data obtained in our study. WBC, CRP, and cytokine levels of the study patients were on average higher than the reference values for the general population, but a significant difference between septic and non-septic intensive care patients was observed only for WBC. The AUC of elevated WBC (0.78 ± 0.11) indicates an acceptable diagnostic accuracy. There are, however, sepsis courses with normal WBC or leukopenia that are not covered by this parameter [49].

With regard to the proven suitability of miRNAs as biomarkers in oncology, the determination of these nucleic acids is discussed as a potential tool for sepsis diagnostics as well. Our structured web search of the current scientific literature shows that the majority of relevant studies failed to identify a miRNA-based biomarker that allows a clear distinction between septic and non-septic intensive care patients. Besides, the comparison of the few proposed biomarker miRNAs reveals inconsistent study results on the basis of which no conclusive assessment can be made. The contradictory findings may possibly be explained by the normalization methods used for the qPCR-based miRNA quantification. It should be noted that many authors used qPCR housekeeping oligonucleotides, such as the snRNA U6, which are unsuitable under septic conditions and, therefore, lead to data sets with limited validity and reproducibility [36,37]. Against this background, we have re-examined all miRNA-based biomarkers that have been suggested in the scientific literature allowing for the first time a direct comparison of these miRNAs in the same study cohort. The list of the investigated miRNA-based biomarker candidates was extended by those miRNAs that could be identified in an experimental approach using NGS. To avoid distortions due to incorrect normalization, miRNA quantification was done using the housekeeper-independent method ddPCR, which has not been applied in this field of research until now. The ddPCR allows an absolute quantification of individual nucleotide molecules leading to an excellent quality and comparability of data. We could already confirm the validity of this method in an earlier publication on quantification of nucleic acids under septic conditions [45]. Accordingly, we considered it particularly appropriate for the objectives of this study. In our study none of the examined miRNAs, neither the candidates derived from literature nor the candidates derived from sequencing, showed a diagnostic power superior to other parameters. Of the eight miRNAs tested, two miRNAs (miR-26b-5p and miR-193-3p) displayed a significant difference between septic and non-septic intensive care patients at time of admission to ICU. However, it should be noted that these miRNAs did not allow the differentiation between healthy volunteers and septic patients. The diagnostic validity of these miRNAs is therefore questionable. One reason for this could be the rapidity with which miRNAs are up- or down-regulated under inflammatory conditions. According to an examination on mice there are considerable fluctuations within a few hours [50]. This considerably reduces the time window for blood sampling and thus the usability of miRNA-based sepsis

biomarkers in clinical diagnostics. In fact, there might be significant changes in miRNA serum levels of particular miRNAs at certain points of sepsis progression. However, this is not relevant for the use of biomarkers, since such a parameter needs to be stable over time for a reliable diagnosis in clinical practice. Moreover, for three of the candidates (miR-122-5p, miR-143-3p, miR-486-3p) it has already been demonstrated that these are significantly influenced by gender and age [51]. Since it is unclear which other factors can influence the serum concentrations of miRNAs in sepsis patients, the eligibility of miRNAs in sepsis diagnostics appears doubtful.

The SOFA score and SAPS II achieved the most coherent results in this study. These scoring systems were developed in the 1990s to predict the outcome of patients in intensive care units independent of the underlying disease [52–54]. According to our data, both scoring systems allow the distinction of septic and non-septic intensive care patients with a relatively low variance and a high diagnostic quality (AUC of SOFA score: 0.80 ± 0.09 ; AUC of SAP score II: 0.76 ± 0.10), which may be explained by the complex composition of the scores that corresponds to the pathophysiology of sepsis as a multi-organ failure. Our data also indicate that the SOFA score can be further improved by including additional parameters. The miRNA miR-193-3p might be a possible item here in an updated version. For this reason, we recommend the use of complex scoring systems, especially the SOFA score, not only for prognostic but also for diagnostic purposes.

5. Conclusions

Summarizing, all markers described for sepsis have only a moderate informative power on their own and do not allow an unequivocal differentiation between septic and non-septic intensive care patients. Our study shows that the SOFA score is most likely to provide a reliable diagnosis but cannot provide certainty as a standalone. Hence, various parameters should be measured and always be considered in the context of the clinical picture and dynamics. A significantly increased SOFA value can, however, be a clear indication of the development of sepsis, especially if there is a clinically plausible suspicion of infection.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2075-4418/10/9/701/s1, Figure S1: title, Table S1: title, Video S1: title.

Author Contributions: Conceptualization, J.S.; formal analysis, F.L. and J.S.; investigation, F.L. and K.K.; resources, A.C. and A.-M.B.; data curation, F.L.; writing—original draft preparation, F.L.; writing—review and editing, J.S.; supervision, J.S.; project administration, J.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a research scholarship from the Hans Böckler Foundation (Grant number 394216). The funding body was not involved in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript. Further we acknowledge financial support within the funding program Open Access Publishing by the German Research Foundation (DFG). Other support was provided solely from departmental sources.

Acknowledgments: We thank the Hans Böckler Foundation and the Julius Bernstein Institute for Physiology for their generous support in conducting this study. We further thank the head of our clinic, Michael Bucher, for general support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Angus, D.C.; van der Poll, T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 840–851.
2. SepNet Critical Care Trials Group. Incidence of Severe Sepsis and Septic Shock in German Intensive Care Units: The Prospective, Multicentre Insep Study. *Intensiv. Care Med.* **2016**, *42*, 1980–1989.
3. Dellinger, R.P.; Levy, M.M.; Rhodes, A.; Annane, D.; Gerlach, H.; Opal, S.M.; Sevransky, J.E.; Sprung, C.L.; Douglas, I.S.; Jaeschke, R.; et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock. *Intensiv. Care Med.* **2013**, *39*, 165–228.

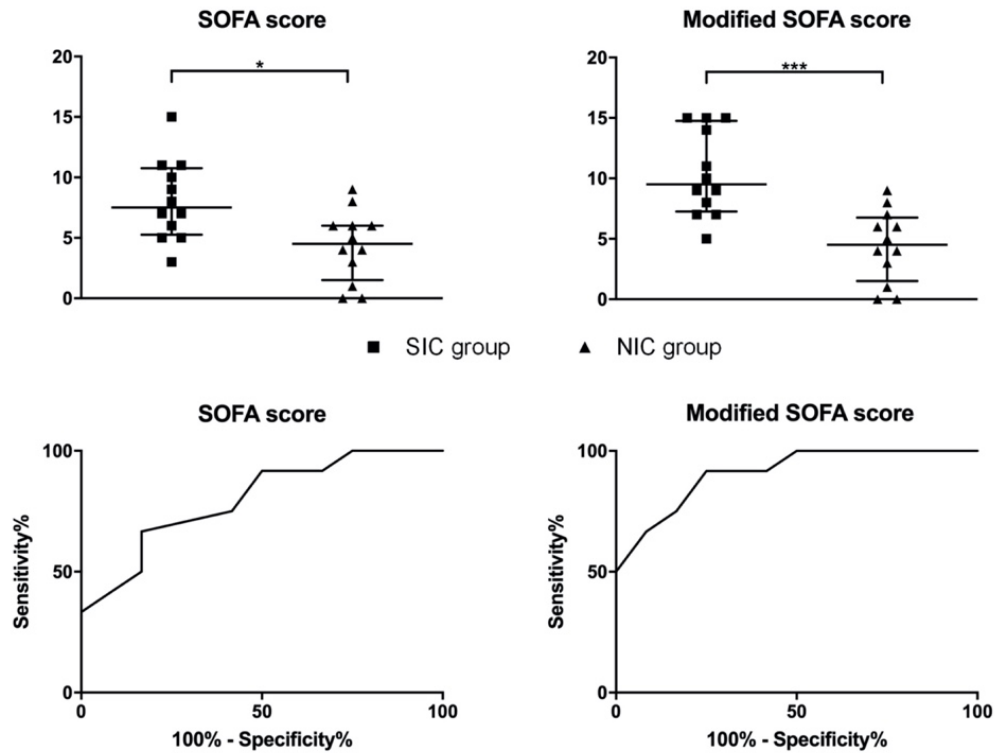
4. Coopersmith, C.M.; De Backer, D.; Deutschman, C.S.; Ferrer, R.; Lat, I.; Machado, F.R.; Martin, G.S.; Martin-Loeches, I.; Nunnally, M.E.; Antonelli, M.; et al. Surviving Sepsis Campaign: Research Priorities for Sepsis and Septic Shock. *Intensiv. Care Med.* **2018**, *44*, 1400–1426.
5. Pierrakos, C.; Vincent, J.-L. Sepsis biomarkers: A review. *Crit. Care* **2010**, *14*, R15, doi:10.1186/cc8872.
6. Fan, S.-L.; Miller, N.S.; Lee, J.; Remick, D.G. Diagnosing sepsis—The role of laboratory medicine. *Clin. Chim. Acta* **2016**, *460*, 203–210.
7. Wacker, C.; Prkno, A.; Brunkhorst, F.M.; Schlattmann, P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13*, 426–435.
8. Chaudhry, H.; Zhou, J.-H.; Zhong, Y.; Ali, M.M.; McGuire, F.; Nagarkatti, P.S.; Nagarkatti, M. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo* **2013**, *27*, 669–684.
9. Pinsky, M.R.; Vincent, J.L.; Deviere, J.; Alegre, M.; Kahn, R.J.; Dupont, E. Serum Cytokine Levels in Human Septic Shock. Relation to Multiple-System Organ Failure and Mortality. *Chest* **1993**, *103*, 565–575.
10. Blackwell, T.S.; Christman, J.W. Sepsis and cytokines: Current status. *Br. J. Anaesth.* **1996**, *77*, 110–117.
11. Bozza, F.A.; Salluh, J.I.F.; Japiassú, A.M.; Soares, M.; Assis, E.F.; Gomes, R.N.; Bozza, M.T.; Castro-Faria-Neto, H.C.; Bozza, P.T. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: A multiplex analysis. *Crit. Care* **2007**, *11*, R49.
12. Kartal, E.D.; Karkac, E.; Gulbas, Z.; Alpat, S.N.; Erben, N.; Colak, E. Several Cytokines and Protein C Levels with the Apache II Scoring System for Evaluation of Patients with Sepsis. *Balk. Med. J.* **2012**, *29*, 174–178.
13. Lvovsch, V.; Arnaud, L.; Parizot, C.; Freund, Y.; Juillien, G.; Ghillani-Dalbin, P.; Bouberima, M.; Larsen, M.; Riou, B.; Gorochov, G.; et al. Cytokine Profiles in Sepsis Have Limited Relevance for Stratifying Patients in the Emergency Department: A Prospective Observational Study. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28870.
14. Surbatovic, M.; Popovic, N.; Vojvodic, D.; Milosevic, I.; Acimovic, G.; Stojičić, M.; Veljovic, M.; Jevdjic, J.; Djordjevic, D.; Radakovic, S. Cytokine profile in severe gram-positive and gram-negative abdominal sepsis. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11355.
15. Thijs, L.G.; Hack, C.E. Time course of cytokine levels in sepsis. *Intensiv. Care Med.* **1995**, *21* (Suppl. S2), S258–S263.
16. Sprague, A.H.; Khalil, R.A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 539–552.
17. Shahkar, L.; Keshtkar, A.; Mirfazeli, A.; Ahani, A.; Roshandel, G. The Role of IL-6 for Predicting Neonatal Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iran. J. Pediatr.* **2011**, *21*, 411–417.
18. Vincent, J.-L.; Moreno, R. Clinical review: Scoring systems in the critically ill. *Crit. Care* **2010**, *14*, 207.
19. Vincent, J.-L.; Sakr, Y. SOFA so good for predicting long-term outcomes. *Resuscitation* **2012**, *83*, 537–538.
20. Wang, J.-F.; Yu, M.-L.; Yu, G.; Bian, J.; Deng, X.M.; Wan, X.-J.; Zhu, K.-M. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *394*, 184–188.
21. Wang, H.; Meng, K.; Chen, W.J.; Feng, D.; Jia, Y.; Xie, L. Serum Mir-574-5p: A Prognostic Predictor of Sepsis Patients. *Shock* **2012**, *37*, 263–267.
22. Wang, H.; Zhang, P.; Chen, W.; Feng, D.; Jia, Y.; Xie, L. Serum MicroRNA Signatures Identified by Solexa Sequencing Predict Sepsis Patients' Mortality: A Prospective Observational Study. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38885.
23. Wang, H.-J.; Zhang, P.-J.; Chen, W.-J.; Feng, D.; Jia, Y.-H.; Xie, L.-X. Four serum microRNAs identified as diagnostic biomarkers of sepsis. *J. Trauma Acute Care Surg.* **2012**, *73*, 850–854.
24. Roderburg, C.; Luedde, M.; Cardenas, D.V.; Vucur, M.; Scholten, D.; Frey, N.; Koch, A.; Trautwein, C.; Tacke, F.; Luedde, T. Circulating MicroRNA-150 Serum Levels Predict Survival in Patients with Critical Illness and Sepsis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54612.
25. Wang, H.-J.; Zhang, P.-J.; Chen, W.-J.; Jie, D.; Dan, F.; Jia, Y.-H.; Xie, L.-X. Characterization and Identification of Novel Serum MicroRNAs in Sepsis Patients With Different Outcomes. *Shock* **2013**, *39*, 480–487.
26. Wang, L.; Wang, H.-C.; Chen, C.; Zeng, J.; Wang, Q.; Zheng, L.; Yu, H.-D. Differential expression of plasma miR-146a in sepsis patients compared with non-sepsis-SIRS patients. *Exp. Ther. Med.* **2013**, *5*, 1101–1104.
27. Chen, J.; Jiang, S.; Cao, Y.; Yang, Y. Altered miRNAs Expression Profiles and Modulation of Immune Response Genes and Proteins During Neonatal Sepsis. *J. Clin. Immunol.* **2014**, *34*, 340–348.
28. Huang, J.; Sun, Z.; Yan, W.; Zhu, Y.; Lin, Y.; Chen, J.; Shen, B.; Wang, J. Identification of MicroRNA as Sepsis Biomarker Based on miRNAs Regulatory Network Analysis. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 594350.
29. Benz, F.; Tacke, F.; Luedde, M.; Trautwein, C.; Luedde, T.; Koch, A.; Roderburg, C. Circulating MicroRNA-223 Serum Levels Do Not Predict Sepsis or Survival in Patients with Critical Illness. *Dis. Markers* **2015**, *2015*, 384208.

30. Caserta, S.; Kern, F.; Cohen, J.; Drage, S.; Newbury, S.F.; Llewelyn, M.J. Circulating Plasma microRNAs can differentiate Human Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28006.
31. Han, Y.; Dai, Q.-C.; Shen, H.-L.; Zhang, X.-W. Diagnostic value of elevated serum miRNA-143 levels in sepsis. *J. Int. Med. Res.* **2016**, *44*, 875–881.
32. Reithmair, M.; Buschmann, D.; Märte, M.; Kirchner, B.; Hagl, D.; Kaufmann, I.; Pfob, M.; Chouker, A.; Steinlein, O.K.; Pfaffl, M.W.; et al. Cellular and extracellular miRNAs are blood-compartment-specific diagnostic targets in sepsis. *J. Cell. Mol. Med.* **2017**, *21*, 2403–2411.
33. Krutzfeldt, J.; Poy, M.N.; Stoffel, M. Strategies to determine the biological function of microRNAs. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, S14–S19.
34. Kozomara, A.; Griffiths-Jones, S. miRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D68–D73.
35. Wang, H.; Peng, R.; Wang, J.; Qin, Z.; Xue, L. Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: The advantage and disadvantage. *Clin. Epigenet.* **2018**, *10*, 59.
36. Benz, F.; Roderburg, C.; Cardenas, D.V.; Vucur, M.; Gautheron, J.; Koch, A.; Zimmermann, H.; Janssen, J.; Nieuwenhuijsen, L.; Luedde, M.; et al. U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Exp. Mol. Med.* **2013**, *45*, e42.
37. Xiang, M.; Zeng, Y.; Yang, R.; Xu, H.; Chen, Z.; Zhong, J.; Xie, H.; Xu, Y.; Zeng, X. U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *454*, 210–214.
38. Benz, F.; Roy, S.; Trautwein, C.; Roderburg, C.; Luedde, T. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 78.
39. Correia, C.N.; Nalpas, N.C.; McLoughlin, K.E.; Browne, J.A.; Gordon, S.V.; MacHugh, D.E.; Shaughnessy, R.G. Circulating microRNAs as Potential Biomarkers of Infectious Disease. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 118.
40. Dumache, R.; Rogobete, A.F.; Bedreag, O.H.; Sarandan, M.; Cradigati, A.C.; Papurica, M.; Dumbuleu, C.M.; Nartita, R.; Sandesc, D. Use of miRNAs as Biomarkers in Sepsis. *Anal. Cell. Pathol.* **2015**, *2015*, 186716.
41. Miotke, L.; Lau, B.T.; Rumma, R.T.; Ji, H.P. High Sensitivity Detection and Quantitation of DNA Copy Number and Single Nucleotide Variants with Single Color Droplet Digital Pcr. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2618–2624.
42. Campomenosi, P.; Gini, E.; Poli, A.; D'Antona, P.; Rotolo, N.; Dominioni, L.; Imperatori, A.; Noonan, D.M. A comparison between quantitative PCR and droplet digital PCR technologies for circulating microRNA quantification in human lung cancer. *BMC Biotechnol.* **2016**, *16*, 60.
43. Wang, C.; Ding, Q.; Plant, P.; Basheer, M.; Yang, C.; Tawedrous, E.; Krizova, A.; Boulos, C.; Farag, M.; Cheng, Y.; et al. Droplet digital PCR improves urinary exosomal miRNA detection compared to real-time PCR. *Clin. Biochem.* **2019**, *67*, 54–59.
44. Singer, M.; Deutschman, C.S.; Seymour, C.W.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G.R.; Chiche, J.-D.; Coopersmith, C.M.; et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **2016**, *315*, 801–810.
45. Link, F.; Krohn, K.; Schumann, J. Identification of Stably Expressed Housekeeping Mirnas in Endothelial Cells and Macrophages in an Inflammatory Setting. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12786.
46. Cohen, J. Statistical Power Analysis for the Behavioral-Sciences. *Percept. Motor Ski.* **1988**, *67*, 1007.
47. Sandquist, M.; Wong, H.R. Biomarkers of sepsis and their potential value in diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2014**, *10*, 1349–1356.
48. Walley, K.R. Biomarkers in Sepsis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2013**, *15*, 413–420.
49. Iskander, K.N.; Osuchowski, M.F.; Stearns-Kurosawa, D.J.; Kurosawa, S.; Stepien, D.M.; Valentine, C.; Remick, D. Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 1247–1288.
50. Hsieh, C.; Yang, J.C.-S.; Jeng, J.C.; Chen, Y.-C.; Lu, T.-H.; Tzeng, S.-L.; Wu, Y.-C.; Wu, C.-J.; Hsieh, C. Circulating microRNA signatures in mice exposed to lipoteichoic acid. *J. Biomed. Sci.* **2013**, *20*, 2.
51. Ameling, S.; Kacprowski, T.; Chilukoti, R.K.; Malsch, C.; Liebscher, V.; Suhre, K.; Pietzner, M.; Friedrich, N.; Homuth, G.; Hammer, E.; et al. Associations of circulating plasma microRNAs with age, body mass index and sex in a population-based study. *BMC Med. Genom.* **2015**, *8*, 61.
52. Vincent, J.-L.; De Mendonça, A.; Cantraine, F.; Moreno, R.; Takala, J.; Suter, P.M.; Sprung, C.L.; Colardyn, F.; Blecher, S. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units. *Crit. Care Med.* **1998**, *26*, 1793–1800.

53. Vincent, J.L.; Moreno, R.; Takala, J.; Willatts, S.; De Mendonça, A.; Bruining, H.; Reinhart, C.K.; Suter, P.M.; Thijs, L.G.; on behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensiv. Care Med.* **1996**, *22*, 707–710.
54. Le Gall, J.R.; Lemeshow, S.; Saulnier, F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* **1993**, *270*, 2957–2963.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Supplementary Figure 1. The sequential organ failure assessment (SOFA) score was determined for every patient enrolled in the septic intensive care (SIC) and the nonseptic intensive care (NIC) group. Modification of SOFA score was based on copy count of the potential miRNA marker miR-193-3p. For determination of the modified SOFA score the mean and standard deviation of miR-193-3p copy counts in the NIC group were calculated. One score point was added for a number of copies exceeding two standard deviations and up to four points for each further standard deviation above. Data are presented as median $\pm$ IQR; the asterisk denotes a significant group difference (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

Supplementary Table 1. Intra-group variability of miRNA expression

miRNA	HC group n = 12	SIC group n = 12	NIC group n = 12
miR-26b-5p	84,9%	85,6%	69,5%
miR-92-3p	160,6%	93,5%	93,6%
miR-122-5p	120,7%	197,3%	79,9%
miR-143-3p	35,9%	56,2%	30,1%
miR-146a-5p	73,7%	110,7%	139,0%
miR-193-3p	103,2%	66,4%	67,0%
miR-223-3p	188,0%	74,4%	115,2%
miR-486-3p	57,9%	45,5%	43,0%
miR-486-5p	122,6%	134,5%	159,1%

To assess the intra-group variability of selected miRNAs, the coefficient of variation (CV) was calculated individually for the study groups. Data are presented as percentage.

6 Publikation II

Link F, Krohn K, Schumann J (2019) Identification of stably expressed housekeeping miRNAs in endothelial cells and macrophages in an inflammatory setting.

Journal: Scientific Reports (Impact Factor 2021/2022: 4,38)

DOI: 10.1038/s41598-019-49241-7

Zusammenfassung:

Die bei der Quantifizierung von Nukleinsäure-Polymeren per quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) gewonnenen Rohdaten müssen mittels eines Housekeepers normalisiert werden, um vergleichbare Datensätze zu generieren. Das Ziel der vorliegenden Studie war daher die Identifizierung von geeigneten Referenznukleinsäuren zur Untersuchung von miRNAs in entzündlichen Milieus für Endothelzellen (Zelllinie: TIME) und Makrophagen (Zelllinie: RAW264.7). In der Versuchsgruppe wurden Zellen mit entzündungsmodulierenden Mediatoren (Zytokinen, Lipopolysacchariden und ungesättigten Fettsäuren) behandelt; die Kontrollgruppe bildeten unbehandelte Zellen der gleichen Zelllinie. Die Vorauswahl geeigneter miRNAs wurde auf Basis einer Hochdurchsatz-Sequenzierung getroffen und die Daten anschließend mittels qRT-PCT und digitaler Tröpfchen-Polymerasekettenreaktion (digital droplet polymerase chain reaction, ddPCR) validiert. Für die Endothelzelllinie TIME zeigten sich miR-151a-5p sowie let-7g-5p, let-7i-5p und miR-127-3-p stabil exprimiert und somit als Housekeeper geeignet. Für Experimente an der Makrophagenzelllinie RAW264.7 konnten miR-27b-3p, miR-103a-3p, miR-16-5p und miR-423 als geeignete Housekeeper identifiziert werden.

Darstellung der Eigenleistung:

Vorbereitung der Experimente, RNA-Präparation; miRNA-Quantifizierung mittels qRT-PCR und ddPCR; statistische Auswertung der Datensätze, Mitverfassen des Artikeltexts.

OPEN

Identification of stably expressed housekeeping miRNAs in endothelial cells and macrophages in an inflammatory setting

Fabian Link¹, Knut Krohn² & Julia Schumann¹

Received: 13 December 2018
Accepted: 22 August 2019
Published online: 04 September 2019

Reliable quantification of miRNA expression by qRT-PCR crucially depends on validated housekeepers for data normalization. Here we present thoroughly tested miRNAs eligible as references in immunological studies utilizing endothelial cells and macrophages, respectively. Endothelial cells (cell line: TIME) and macrophages (cell line: RAW264.7) were treated with various pro- and anti-inflammatory mediators (cytokines, LPS, unsaturated fatty acids) given as either single substances or in combination. Isolated RNA was screened for stably expressed miRNAs by next generation sequencing. Housekeeper candidates were thereafter validated by means of two independent quantification techniques: qRT-PCR for relative quantification and ddPCR for absolute quantification. Both methods consistently confirmed the suitability of let-7g-5p, let-7i-5p, miR-127-3p and miR-151a-5p in cytokine/fatty acid-treated TIME and miR-16-5p, miR-27b-3p, miR-103a-3p and miR-423-3p in LPS/fatty acid-treated RAW264.7, respectively as housekeeping miRNAs. With respect to abundance and over all expression stability the miRNAs miR-151a-5p (cell line: TIME) as well as miR-27b-3p and miR-103a-3p (cell line: RAW264.7) can be particularly recommended for normalization of qRT-PCR data.

MicroRNAs (miRNAs) have become an object of intense research in biomedical sciences as they play an important role in the regulation of complex biological systems by repressing gene translation^{1–3}. For example, miRNAs are involved in inflammatory processes and have been linked to endothelial dysfunction^{4–6} and macrophage polarization^{7–9}. Further on, miRNA expression alterations have been described in oncological¹⁰ or various other diseases^{11,12} which makes them a promising tool in clinical diagnostics. In order to gain a detailed molecular and mechanistic understanding of miRNA functions as well as to verify the usefulness of miRNAs as innovative diagnostic biomarkers precise quantification tools are imperatively required.

A method often used for miRNA quantification is the Real-Time polymerase chain reaction (qRT-PCR)^{13,14}. Modern qRT-PCR systems detect the fluorescent signal of a reporter dye after every cycle and determine the cycle in which the signal exceeds an arbitrarily set threshold¹⁵. This cycle number (called “Ct value”) is a measuring unit for the target abundance relative to a defined housekeeping nucleic acid which is used for normalization¹⁶. An absolute prerequisite to reliably compensate procedural and biological variability is the independency and stability of the chosen housekeeper^{17–20}. The selection of an adequate housekeeper, therefore, is a key point in qRT-PCR analysis. However, with respect to miRNA quantification this has proven to be a difficult issue.

Housekeeping genes typically used for messenger RNA (mRNA) quantification like GAPDH and β -actin are considerably larger than miRNAs. As the amplification efficiency depends on DNA size these housekeepers are inappropriate for miRNA qRT-PCR²¹. Small nuclear and nucleolar RNAs, such as U6 or SNORD44, are more suitable with respect to size but their eligibility has been found to be limited, too. There is evidence that the expression rate of these housekeepers differs among tissue types and shows inter-individual variations²². In addition, these normalizers seem to be affected by the surrounding milieu, e.g. the presence of cytokines^{23–25}. Another problem is that the nuclear/nucleolar RNAs differ from miRNAs in biochemical properties which could lead to normalization bias^{26,27}. Housekeepers belonging to the same type of RNA, therefore, appear to be particularly appropriate

¹Clinic for Anaesthesiology and Operative Intensive Care, University Hospital Halle (Saale), Halle, Saale, Germany.

²Core Unit DNA Technologies, Medical Faculty, Leipzig University, Leipzig, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.S. (email: julia.schumann@uk-halle.de)

Cell line	miRNA	Coefficient of variation	Stability value
TIME	let-7g-5p	0.13	0.20
TIME	let-7i-5p	0.14	0.19
TIME	miR-106b-3p	0.14	0.16
TIME	miR-127-3p	0.14	0.20
TIME	miR-151a-5p	0.09	0.09
RAW264.7	miR-10a-5p	0.11	0.12
RAW264.7	miR-16-5p	0.09	0.12
RAW264.7	miR-27b-3p	0.10	0.11
RAW264.7	miR-103a-3p	0.10	0.12
RAW264.7	miR-423-3p	0.09	0.09

Table 1. Potential housekeeping miRNAs selected from screening based on NGS.

for normalization. Hence, there is a need for the identification of stably expressed housekeeper miRNAs with respect to the experimental setting.

Here we present thoroughly tested miRNAs eligible as housekeepers in immunological studies utilizing endothelial cells and macrophages, respectively. The expression rate of the identified housekeeper miRNAs was proven to be virtually unaffected by several pro- and anti-inflammatory mediators (cytokines, LPS, unsaturated fatty acids) given as either single substances or in combination.

Results

Next generation sequencing (NGS). To identify adequate housekeeping genes for qRT-PCR on endothelial cells (cell line: TIME) and macrophages (cell line: RAW264.7) under inflammatory conditions a NGS-based screening was carried out. In TIME treated with the cytokines IL-1 β , TNF- α and IFN- γ (5 ng/ml each) 1173 different miRNAs were detected compared with 1093 miRNAs in unstimulated control cells. In RAW264.7 treated with LPS (1 μ g/ml) 236 different miRNAs were detected compared with 235 miRNAs in unstimulated control cells. For those miRNAs detectable in both stimulated and unstimulated cells the coefficient of variation (CV) and NormFinder stability value over all samples was calculated to find the most stable expressed ones. Low CV and stability value indicate a stable miRNA expression. The five miRNAs with the lowest CV and stability value were elected for both cell types as potential housekeeper candidates (Table 1).

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Eligibility of selected miRNAs as housekeepers under the influence of inflammatory mediators was validated by means of qRT-PCR. The melting curves confirmed the specificity of all primers used. An amplification efficiency between 0.90 and 1.10 was considered sufficient.

All of the five housekeeper candidates for TIME were detected in qRT-PCR while they differed substantially in abundance. The highest expression rate was measured for let-7i-5p with a mean Ct value of 26.52. Lowest abundance was found for miR-106b-3p with a mean Ct value of 35.25. As expected from NGS screening data expression rates of the miRNAs let-7g-5p, let-7i-5p, miR-127-3p and miR-151a-5p were not significantly affected by cytokine stimulation (Fig. 1). Likewise, supplementation of unsaturated fatty acids or a combination of cytokine and fatty acid treatment did not alter the expression rate (Fig. 1). Of those miRNAs with a mean Ct value below 30, miR-151a-5p showed the lowest over all variation at implemented experimental conditions. Unlike the aforementioned miRNAs the miR-106b-3p displayed significant group differences between treatment groups (Supplementary Fig. S1) which render it unsuitable as a housekeeper.

For RAW264.7 qRT-PCR-based detection was successful for each of the five housekeeping candidates. miR-27b-3p was found to be the most abundant one with a mean Ct value of 25.98. The lowest expression rate was detected for miR-10a-5p with a mean Ct value of 35.44. As displayed in Fig. 2 the miRNAs miR-16-5p, miR-27b-3p, miR-103a-3p and miR-423-3p were nearly unaltered under the influence of LPS stimulation, unsaturated fatty acid supplementation or combination treatment. Of those miRNAs with a mean Ct value below 30, miR-27b-3p and miR-103a-3p were the most invariant ones. On the contrary miR-10a-5p showed some variations in expression rates due to cytokine and/or fatty acid treatment (Supplementary Fig. S2).

Droplet digital PCR (ddPCR). For a deeper insight on expression changes of housekeeper candidates we additionally performed an absolute quantification of the miRNAs by means of the Droplet Digital PCR (ddPCR) technology.

In line with the results from the qRT-PCR in TIME cells let-7i-5p showed the highest abundance (25089 copies per ng RNA on average of all test groups) and miR-106b-3p the lowest abundance (380 copies per ng RNA on average of all test groups) of the analysed miRNAs. The ddPCR analysis further confirmed the eligibility of the miRNAs let-7g-5p, let-7i-5p, miR-127-3p and miR-151a-5p as housekeepers under the influence of cytokines and/or unsaturated fatty acids (Fig. 3). The fold changes in miRNA expression rate induced by cytokine treatment and/or unsaturated fatty acid supplementation did not exceed 0.25 for all of these miRNAs (Fig. 3) which is also evident from the low average differences in absolute copy counts of stimulated compared to unstimulated TIME cells (Table 2). For miR-106b-3p the fold change in miRNA expression rate was found to be higher but not significantly altered compared to untreated control (Supplementary Fig. S1).

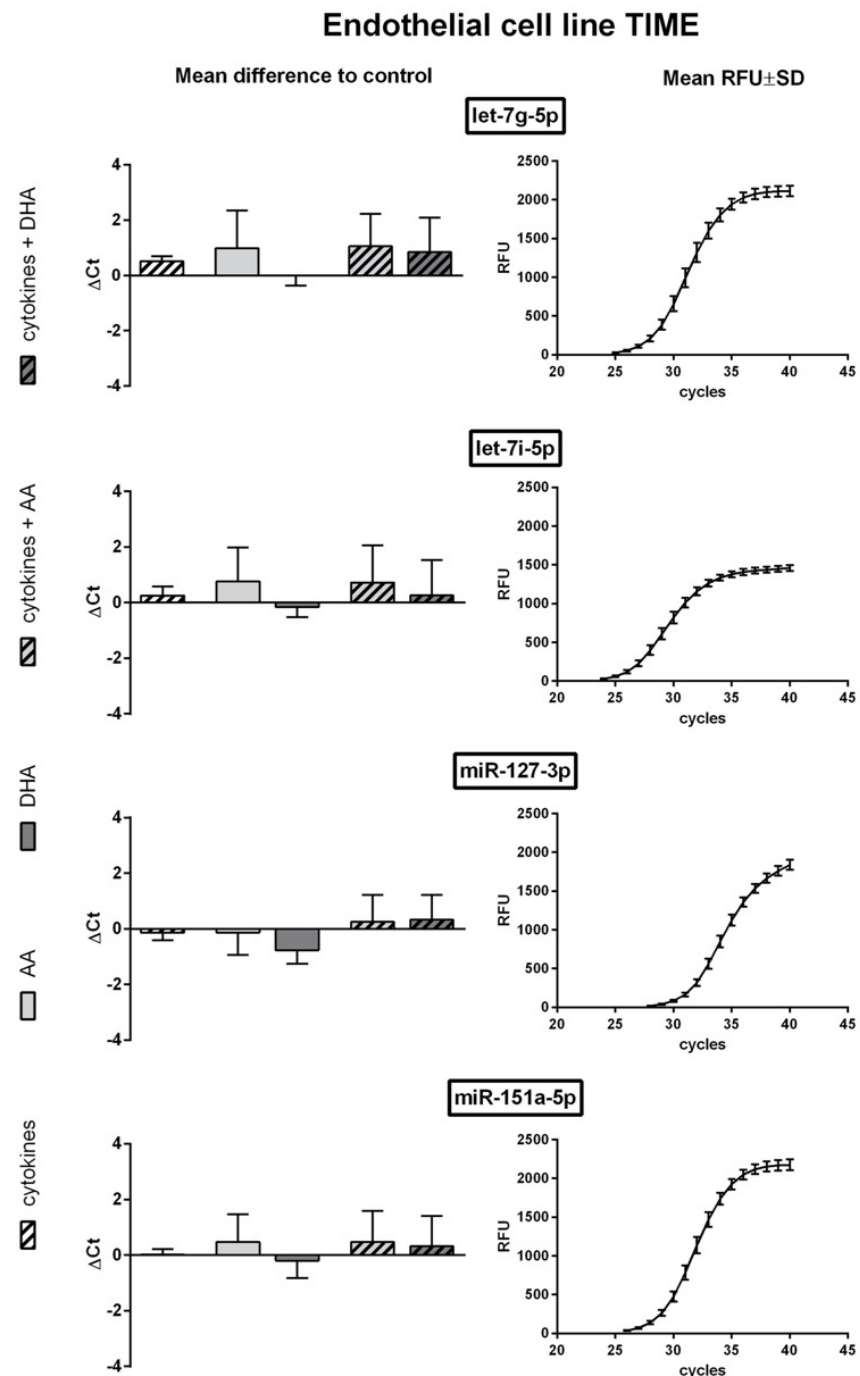


Figure 1. qRT-PCR data of TIME cells. TIME were stimulated with a cytokine mix consisting of IL-1 β , TNF- α and IFN- γ (each in a concentration of 5 ng/ml) and/or supplemented with the unsaturated fatty acids docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3) or arachidonic acid (AA, C20:4n6). Quantification of miRNA expression was performed by means of the miRCURY LNA SYBR Green PCR kit and appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers on a CFX96 Touch Real Time PCR detection system (N = 4, n = 2). The fluorescence signal of all samples was measured at the end of every PCR cycle as relative fluorescent unit (RFU). miRNA expression is displayed as mean difference to unstimulated control on the basis of raw Ct values. The mean RFU values and standard deviations are plotted as a sigmoidal curve.

Likewise for RAW264.7 a high consistency was seen between qRT-PCR and ddPCR data. With a mean of 121174 copies per ng RNA miR-27b-3p was the most abundant of the miRNAs analysed. The lowest expression rate (1975 copies per ng RNA on average of all test groups) was found for miR-10a-5p. LPS stimulation

Macrophage cell line RAW267.4

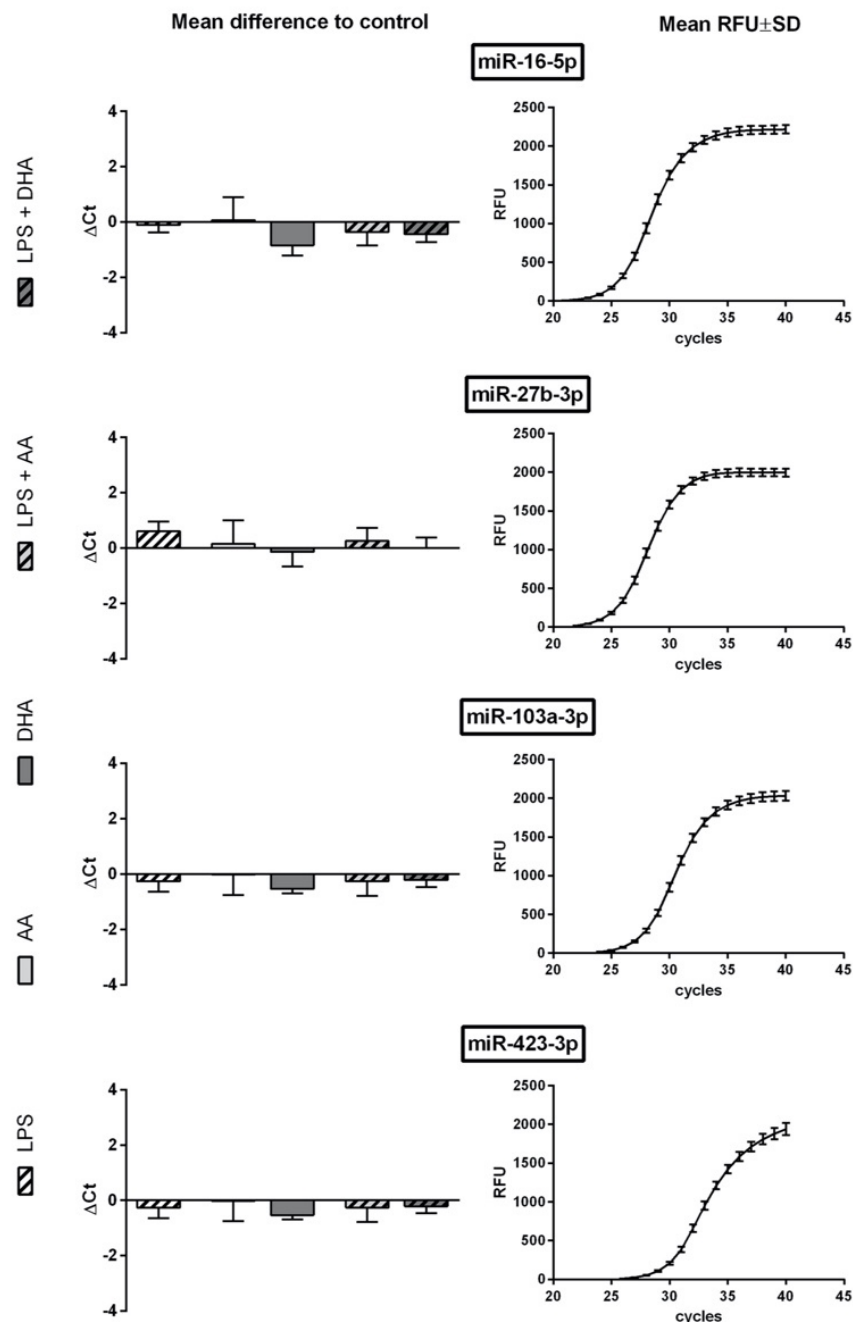


Figure 2. qRT-PCR data of RAW267.4 cells. RAW267.4 were stimulated with LPS (1 μ g/ml) and/or supplemented with the unsaturated fatty acids docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3) or arachidonic acid (AA, C20:4n6). Quantification of miRNA expression was performed by means of the miRCURY LNA SYBR Green PCR kit and appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers on a CFX96 Touch Real Time PCR detection system (N=4, n=2). The fluorescence signal of all samples was measured at the end of every PCR cycle as relative fluorescent unit (RFU). miRNA expression is displayed as mean difference to unstimulated control on the basis of raw Ct values. The mean RFU values and standard deviations are plotted as a sigmoidal curve.

and/or unsaturated fatty acid supplementation did not lead to significant alterations in the expression of miR-16-5p, miR-27b-3p, miR-103a-3p and miR-423-3p (Fig. 4). The induced fold change in miRNA expression rate did not exceed 0.40 for all of these miRNAs (Fig. 4). This can also be deduced from the average differences in

Endothelial cell line TIME

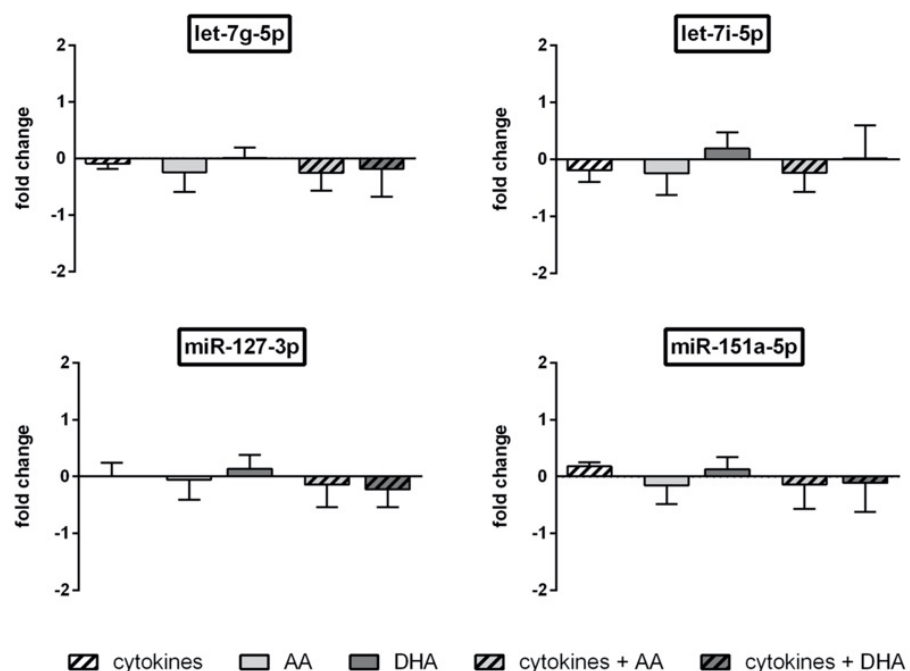


Figure 3. ddPCR data of TIME cells. TIME were stimulated with a cytokine mix consisting of IL-1 β , TNF- α and IFN- γ (each in a concentration of 5 ng/ml) and/or supplemented with the unsaturated fatty acids docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3) or arachidonic acid (AA, C20:4n6). Absolute quantification of miRNA expression was performed by means of the EvaGreen Supermix and appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers on a QX200 ddPCR droplet reader system (N = 4, n = 2). miRNA expression was measured as RNA molecules per μ l sample. Results are displayed as fold change to unstimulated control.

Cell type	miRNA	Mean copy count of untreated control	Mean difference induced by LPS/ cytokines and/or fatty acids
TIME	let-7g-5p	15111	2332
TIME	let-7i-5p	27198	4807
TIME	miR-127-3p	1675	189
TIME	miR-151a-5p	8965	1279
RAW264.7	miR-16-5p	105490	21978
RAW264.7	miR-27b-3p	164010	51403
RAW264.7	miR-103a-3p	19291	2841
RAW264.7	miR-423-3p	4667	545

Table 2. miRNA copy count differences induced by inflammatory mediators (cytokines, LPS, unsaturated fatty acids).

absolute miRNA copy counts of LPS and/or fatty acid treated RAW264.7 compared to unstimulated controls (Table 2). Expression rate of miR-10a-5p was significantly affected by LPS and/or unsaturated fatty acid treatment (Supplementary Fig. S2).

Discussion

Due to their important role in gene regulation and their potential as diagnostic markers miRNAs have become an important research area in recent years. For quantification of miRNAs qRT-PCR is a common tool providing sensitive and reliable data. However, a basic condition for gaining a sound database is the application of control measures and a proper normalization strategy. To this end different methods are available which should be used with careful consideration.

Spike-in oligonucleotides are exogenous controls added to samples in a constant concentration. They enable monitoring of cDNA synthesis efficiency and are of use for detection of inter-assay variabilities^{28,29}. Normalization based on global mean expression is mainly intended for parallel measurement of multiple targets and miRNA

Macrophage cell line RAW267.4

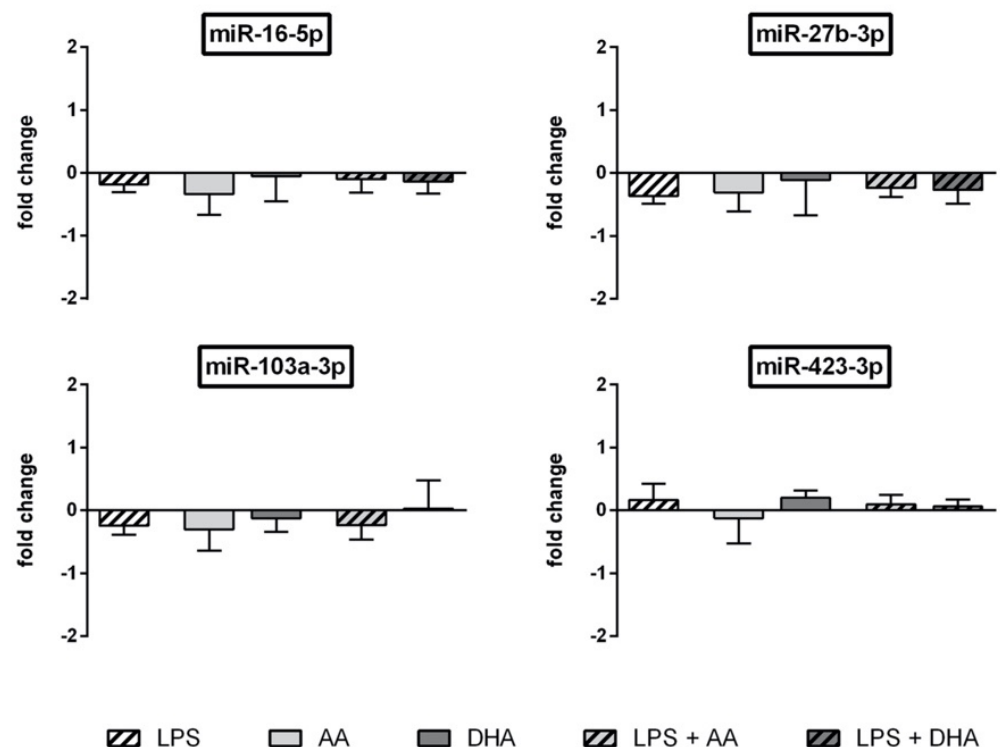


Figure 4. ddPCR data of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were stimulated with LPS (1 µg/ml) and/or supplemented with the unsaturated fatty acids docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3) or arachidonic acid (AA, C20:4n6). Absolute quantification of miRNA expression was performed by means of the EvaGreen Supermix and appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers on a QX200 ddPCR droplet reader system (N = 4, n = 2). miRNA expression was measured as RNA molecules per µl sample. Results are displayed as fold change to unstimulated control.

arrays^{28,29}. In experiments with a limited number of target miRNAs the usability of this method is restricted with respect to the small data record^{28,29}. Housekeepers, in contrast, may even be used for normalization of single target qRT-PCR experiments. These nucleic acids are known to be stably expressed and, therefore, indicate potential intra-assay and inter-assay variabilities^{28,29}. Yet, certain basic conditions have to be met in order to prevent normalization bias. The main criterion for suitability of a housekeeper is a stable expression rate with respect to the analysed cell/tissue type as well as the experimental setting. Further on, an optimal level of conformity in biochemical properties needs to be reached. For that reason housekeeper and target should be of the same RNA type.

A few reports describe the successful application of housekeeping miRNAs in certain disease models and experimental settings investigating particular cells/tissues and treatment conditions (Supplementary Table S1). It should be noted that these studies show considerable variations in the proposed reference miRNAs. This could be attributed to the fact that miRNA expression is described to not only vary among cell and tissue types but also to depend on the surrounding milieu^{30–32}. It seems that there is no miRNA that is eligible as universal housekeeper. Thus, there is a need for defining adequate housekeeping miRNAs with respect to the intended model system. The present study was undertaken in order to establish valid housekeepers for miRNA studies on endothelial cells or macrophages in an inflammatory setting.

Three different techniques were used in a systematically manner. First, NGS was applied to screen all expressed miRNAs (1173 miRNAs for endothelial cell line TIME, 236 miRNAs for macrophage cell line RAW264.7) for their potential eligibility as housekeepers. For both cell lines the five most invariant miRNAs were selected for further validation. Candidates identified were let-7g-5p, let-7i-5p, miR-106b-3p, miR-127-3p and miR-151a-5p for TIME as well as miR-10a-5p, miR-16-5p, miR-27b-3p, miR-103a-3p and miR-423-3p for RAW264.7.

In the next step those miRNAs were analysed using two independent quantification methods: relative quantification by means of qRT-PCR and absolute quantification by means of ddPCR. Both techniques consistently confirmed the suitability of the above mentioned miRNAs as housekeepers in the presence of cytokines/LPS and/or unsaturated fatty acids except for miR-106b-3p (TIME) and miR-10a-5p (RAW264.7). In particular, miR-151a-5p in TIME as well as miR-27b-3p and miR-103a-3p in RAW264.7 can be highly recommended as housekeeping miRNAs with respect to abundance and over all expression stability.

Previous studies propose the use of the geometric mean of multiple housekeepers as an elegant option to minimize normalization bias^{20,33,34}. The validation of four housekeeping miRNAs for both cell types analysed, therefore, represents an opportunity to further optimize qRT-PCR-based quantification.

Remarkably, the majority of the miRNAs identified in our study have already been proposed as housekeepers in the literature (Supplementary Table S1). Whether the identified reference miRNAs might be applied to further cell/tissue types and experimental conditions carefully needs to be validated before being used in any deviant settings. Yet, it is probable that let-7g-5p, let-7i-5p and miR-151a-5p are generally suitable as housekeeping miRNAs in immunological studies investigating vessel cells of mammalian origin. Complementary investigations of our laboratory provides evidence that these miRNAs are stably expressed not only in the endothelial cell line TIME but also in primary murine endothelial cells (mEC) and vascular smooth muscle cells (mVSMC) in either presence or absence of cytokine stimulation (Supplementary Fig. S3).

In order to check the plausibility of the results, the biological function of the proposed reference miRNAs was assessed based on in silico prediction of genomic binding sites from mirWalk³⁵. For GO enrichment focussed on the ontology domain “biological process” G:profiler³⁶ was used and redundant GO terms were removed by subset analysis by means of REVIGO³⁷. Altogether 546 GO term subsets in the biological process domain could be identified. As expected, interrelations of each miRNA with biological processes are diverse and complex. Nevertheless certain functionalities are frequently present. For example, all proposed miRNAs are involved in processes at the neuronal synapse like “synapse organization” (GO:0050808) and “learning and memory” (GO:0007611). Another, frequently occurring pattern is the functional connection to formation of the urogenital tract (GO:0001655) and reproductive system (GO:0061458). A link to inflammatory processes is only found for miR-423-3p as terms like “immune effector process” (GO:0002252) or “leucocyte differentiation” (GO:0002521) are assigned to this miRNA. In this respect, the in silico data are consistent with the results of our study, as the putative and validated functional relations, with the exception of miR-423-3p, do not suggest any change due to an inflammatory milieu.

Over and above the presented data underlines the suitability of ddPCR for a housekeeper-independent absolute quantification of miRNAs. The method has shown to deliver highly reliable and comparable results without necessity of any reference for normalization. In spite of the extra effort and cost this technique might be of benefit in case of unsatisfactory housekeepers.

Materials and Methods

Cell lines and culture media. If not stated otherwise, materials were provided by Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Commercially available cell lines (LGC Standards, Wesel, Germany) were used: the human telomerase-immortalized microvascular endothelial cell line TIME (ATCC number: CRL-4025) as well as the murine macrophage cell line RAW264.7 (ATCC number: TIB-71). TIME were cultured in basal microvascular endothelial cell growth medium (Provitro, Berlin, Germany) enriched with 5 ng/ml VEGF, 5 ng/ml EGF, 5 ng/ml FGF, 15 ng/ml IGF-1, 10 mM L-glutamine, 0.75 U/ml heparin sulphate, 1 µg/ml hydrocortisone hemisuccinate, 50 µg/ml ascorbic acid (all Provitro, Berlin, Germany), 5% v/v FCS, and 12.5 µg/ml blasticidin (Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Germany). Cell culture medium used for RAW264.7 was RPMI 1640 (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) enriched with 5% v/v fetal calf serum (FCS).

Fatty acid supplementation and stimulation of cells. For cellular fatty acid enrichment TIME as well as RAW264.7 were incubated in cell culture medium supplemented with either docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3) or arachidonic acid (AA, C20:4n6) (both Biotrend, Köln, Germany) in a final concentration of 15 µM for 72 hours. For stimulation TIME were treated with a cytokine mix consisting of IL-1β, TNF-α and IFN-γ, each in a concentration of 5 ng/ml (all PeproTech, Hamburg, Germany) and RAW264.7 were treated with 1 µg/ml LPS (from *E. coli* serotype 0111:B4). Stimulation was performed in the last 24 hours of fatty acid supplementation.

RNA isolation. Total RNA isolation was performed using TriFast FL (VWR/Peqlab, Erlangen, Germany) following the manufacturer's standard protocol. RNA concentration and quality was determined by means of a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Germany). An absorbance quotient A260/280 > 1.8 was considered appropriate for following procedures. Complementary DNA (cDNA) was synthesized by means of the miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to standard protocol. Synthesized cDNA was used for both qRT-PCR and ddPCR miRNA expression quantification.

Deep sequencing and analysis of deep sequencing data. miRNA expression analysis was performed using high-throughput sequencing by means of an Illumina HiScanSQ (Illumina Inc., San Diego, USA) in the Core Unit DNA at the Medical Faculty, Leipzig University. In every test group three biological replicates were analysed. Samples were processed using the TruSeq Small RNA Prep kit v2 (Illumina Inc., San Diego, USA) following the manufacturer's standard protocol. Size restriction (140–165 bp), purification and quantification of barcoded libraries were performed using the Library quantification kit - Illumina/Universal (KAPA Biosystems, Woburn, USA). For cluster generation up to 10 libraries per lane were factored using an Illumina cBot. 50 bp sequencing was performed using an Illumina HiScanSQ sequencer based on version 3 chemistry and flowcell following the manufacturer's standard protocol.

For deep sequencing data analysis the adapter sequences were removed from raw sequences by means of Cutadapt software, version 1.9.1³⁸. To verify that small RNAs other than miRNAs are filtered out from the data only sequences 15–27 bases long were analysed. These reads were aligned to human (GRCh38: NCBI Assembly:GCA_000001405.15) and murine (GRCm38: NCBI Assembly:GCA_000001635.2) genome as well as mature sequences of miRBase v21 using the bowtie2 aligner³⁹. An error ratio of 1 nt per mature miRNA sequence was accepted. For data compression to bam format Samtools⁴⁰ were used. Mapped reads count was determined

using the R/Bioconductor programming environment⁴¹ by application of the ShortRead library⁴². Sequence analysis after mapping against mature sequences of miRBase v21 is not affected by counts for other small RNAs (e.g. rRNA, tRNA fragments) because these sequences are not present in the reference sequences. For mapping against the whole genome reference rRNA or tRNA fragments are usually below 1–2% in the 15–27 bp fraction. Reads that map to their respective loci were removed before analysis using genome coordinates. Normalization of data was performed by independent application of the DESeq 2 and the TMM (EdgeR) algorithm⁴³.

Stability of miRNA expression was assessed based on coefficient of variation (CV), which is defined as the ratio of standard deviation to the mean. In addition the bioinformatic VBA tool NormFinder v.0.953 for Microsoft Excel was used to confirm expression stability considering the intra- and intergroup variation⁴⁴.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Relative expression of miRNAs was analysed by means of the miRCURY LNA SYBR Green PCR kit and appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers (both QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Thermal cycling was performed on a CFX96 Touch Real Time PCR detection system (BioRad, Munich, Germany). The cycling conditions comprised initial heat activation at 95 °C for 2 minutes, 40 cycles at 95 °C for 10 seconds and 56 °C for 60 seconds followed by a melt curve analysis. qRT-PCR reactions were performed in duplicates of four biological replicates in every test group.

Droplet digital PCR (ddPCR). miRNA copy counts were determined by means of the Droplet Digital PCR technology (BioRad, Munich, Germany) following the manufacturer's standard protocols. Appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers (QIAGEN, Hilden, Germany) and ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Munich, Germany) were used. Measurement of the nucleic acid copy count per μ l sample was performed on a QX200 ddPCR Droplet Reader (Bio-Rad, Munich, Germany). Data output was converted into nucleic acid copy count per ng RNA. ddPCR reaction was performed in duplicates of four biological replicates in every test group.

Statistical analysis. Data are presented as means $\pm$ standard deviation (SD). To identify statistical differences between means one-way analysis of variance and multiple comparisons with Tukey correction was used. Statistical analysis was performed by means of the GraphPad Prism 6 statistics software (GraphPad Software, La Jolla, USA). A p value < 0.05 was assumed as an indicator of significant differences.

Data Availability

Deep sequencing datasets generated and analysed during the current study are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository, accession number GSE132361.

References

- Bartoszewski, R. & Sikorski, A. F. Editorial focus: entering into the non-coding RNA era. *Cell Mol Biol Lett* **23**, 45, <https://doi.org/10.1186/s11658-018-0111-3> (2018).
- Gurtan, A. M. & Sharp, P. A. The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J Mol Biol* **425**, 3582–3600, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.007> (2013).
- Moreno-Moya, J. M., Vilella, F. & Simon, C. MicroRNA: key gene expression regulators. *Fertil Steril* **101**, 1516–1523, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.10.042> (2014).
- Harris, T. A., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Mendell, J. T. & Lowenstein, C. J. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 1516–1521, <https://doi.org/10.1073/pnas.0707493105> (2008).
- Loyer, X. *et al.* Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice. *Circ Res* **114**, 434–443, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302213> (2014).
- Nemecz, M., Alexandru, N., Tanko, G. & Georgescu, A. Role of MicroRNA in Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Curr Hypertens Rep* **18**, 87, <https://doi.org/10.1007/s11906-016-0696-8> (2016).
- Liu, G. & Abraham, E. MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 170–177, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300068> (2013).
- Wu, X. Q. *et al.* Emerging role of microRNAs in regulating macrophage activation and polarization in immune response and inflammation. *Immunology* **148**, 237–248, <https://doi.org/10.1111/imm.12608> (2016).
- Essandoh, K., Li, Y., Huo, J. & Fan, G. C. MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock* **46**, 122–131, <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000604> (2016).
- Wang, H., Peng, R., Wang, J., Qin, Z. & Xue, L. Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. *Clin Epigenetics* **10**, 59, <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0492-1> (2018).
- Wang, J., Chen, J. & Sen, S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol* **231**, 25–30, <https://doi.org/10.1002/jcp.25056> (2016).
- Kumar, P. *et al.* Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**, e69807, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069807> (2013).
- Chen, C., Tan, R., Wong, L., Fekete, R. & Halsey, J. In *PCR Protocols* (ed Daniel J. P.) 113–134 (Humana Press, 2011).
- Kong, W., Zhao, J. J., He, L. & Cheng, J. Q. Strategies for profiling microRNA expression. *J Cell Physiol* **218**, 22–25, <https://doi.org/10.1002/jcp.21577> (2009).
- Ginzinger, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* **30**, 503–512 (2002).
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> (2001).
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**, 1101–1108 (2008).
- Rice, J., Roberts, H., Rai, S. N. & Galandiuk, S. Housekeeping genes for studies of plasma microRNA: A need for more precise standardization. *Surgery* **158**, 1345–1351, <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.04.025> (2015).
- Morata-Tarifa, C. *et al.* Validation of suitable normalizers for miR expression patterns analysis covering tumour heterogeneity. *Sci Rep* **7**, 39782, <https://doi.org/10.1038/srep39782> (2017).
- Schwarzenbach, H., da Silva, A. M., Calin, G. & Pantel, K. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem* **61**, 1333–1342, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.239459> (2015).
- Mase, M. *et al.* Selection of reference genes is critical for miRNA expression analysis in human cardiac tissue. A focus on atrial fibrillation. *Sci Rep* **7**, 41127, <https://doi.org/10.1038/srep41127> (2017).

22. Xiang, M. *et al.* U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* **454**, 210–214, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.064> (2014).
23. Benz, F. *et al.* U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Exp Mol Med* **45**, e42, <https://doi.org/10.1038/emmm.2013.81> (2013).
24. D'Haene, B., Mestdagh, P., Hellemans, J. & Vandesompele, J. miRNA expression profiling: from reference genes to global mean normalization. *Methods Mol Biol* **822**, 261–272, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-427-8_18 (2012).
25. Reid, G., Kirschner, M. B. & van Zandwijk, N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* **80**, 193–208, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.11.004> (2011).
26. Gee, H. E. *et al.* The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br J Cancer* **104**, 1168–1177, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606076> (2011).
27. Chugh, P. & Dittmer, D. P. Potential pitfalls in microRNA profiling. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**, 601–616, <https://doi.org/10.1002/wrna.1120> (2012).
28. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**, 611–622, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797> (2009).
29. Nolan, T., Huggett, J. & Sanchez, E. *Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR)* (2013).
30. Benes, V. *et al.* Identification of cytokine-induced modulation of microRNA expression and secretion as measured by a novel microRNA specific qPCR assay. *Sci Rep* **5**, 11590, <https://doi.org/10.1038/srep11590> (2015).
31. Das, M. K., Andreassen, R., Haugen, T. B. & Furu, K. Identification of Endogenous Controls for Use in miRNA Quantification in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Genomics Proteomics* **13**, 63–68 (2016).
32. Ludwig, N. *et al.* Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res* **44**, 3865–3877, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw116> (2016).
33. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034 (2002).
34. Marabita, F. *et al.* Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform* **17**, 204–212, <https://doi.org/10.1093/bib/bbv056> (2016).
35. Sticht, C., De La Torre, C., Parveen, A. & Gretz, N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One* **13**, e0206239, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206239> (2018).
36. Raudvere, U. *et al.* g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369> (2019).
37. Supek, F., Bosnjak, M., Skunca, N. & Smuc, T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* **6**, e21800, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800> (2011).
38. Martin, M. *CUTADAPT removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads*. Vol. 17 (2011).
39. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10**, R25, <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25> (2009).
40. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352> (2009).
41. Gentleman, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**, R80, <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r80> (2004).
42. Morgan, M. *et al.* ShortRead: a bioconductor package for input, quality assessment and exploration of high-throughput sequence data. *Bioinformatics* **25**, 2607–2608, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp450> (2009).
43. Stokowy, T. *et al.* Analysis options for high-throughput sequencing in miRNA expression profiling. *BMC Res Notes* **7**, 144, <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-144> (2014).
44. Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Orntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**, 5245–5250, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496> (2004).

Acknowledgements

The authors wish to thank Claudia Rößler, Anja Leimert and Melanie Cieselski for their great assistance in cell culture and RNA isolation. Special thanks to the Hans Böckler Foundation that supported this work by a scholarship (Grant number 394216).

Author Contributions

J.S. conceived and designed the experiments; K.K. performed the NGS analysis; F.L. performed all other experiments; F.L. and J.S. analysed the data; F.L. and J.S. wrote the paper; K.K. reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49241-7>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

miR-106b-3p in endothelial cell line TIME

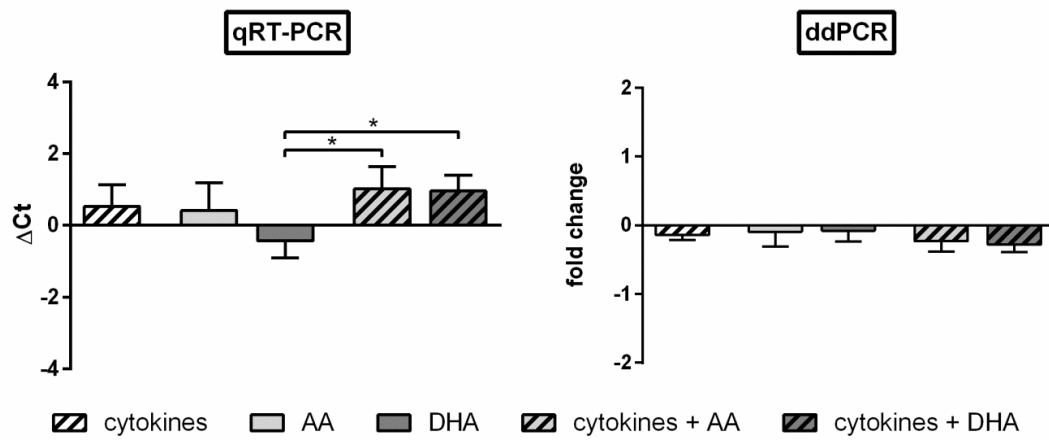


Figure S1: Expression alterations of miR-106b-3p in endothelial cell line TIME.

TIME were stimulated with a cytokine mix consisting of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ (each in a concentration of 5 ng/ml) and/or supplemented with the unsaturated fatty acids docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3) or arachidonic acid (AA, C20:4n6). Relative quantification of miRNA expression (qRT-PCR) was performed by means of the miRCURY LNA SYBR Green PCR kit and appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers on a CFX96 Touch Real Time PCR detection system (N = 4, n = 2). miRNA expression is displayed as mean difference to unstimulated control on the basis of raw Ct values. Absolute quantification of miRNA expression (ddPCR) was performed by means of the EvaGreen Supermix and appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers on a QX200 ddPCR droplet reader system (N = 4, n = 2). miRNA expression was measured as RNA molecules per μ l sample. Results are displayed as fold change to unstimulated control.

* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001

miR-10a-5p in macrophage cell line RAW267.4

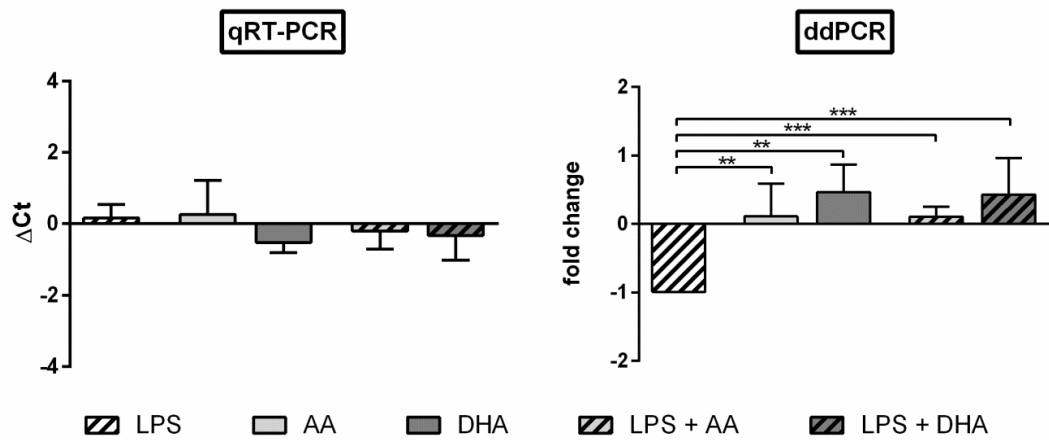


Figure S2: Expression alterations of miR-10a-5p in macrophage cell line RAW264.7.

RAW264.7 were stimulated with LPS (1 µg/ml) and/or supplemented with the unsaturated fatty acids docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3) or arachidonic acid (AA, C20:4n6). Relative quantification of gene expression (qRT-PCR) was performed by means of the miRCURY LNA SYBR Green PCR kit and appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers on a CFX96 Touch Real Time PCR detection system (N = 4, n = 2). miRNA expression is displayed as mean difference to unstimulated control on the basis of raw Ct values. Absolute quantification of miRNA expression (ddPCR) was performed by means of the EvaGreen Supermix and appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers on a QX200 ddPCR droplet reader system (N = 4, n = 2). miRNA expression was measured as RNA molecules per µl sample. Results are displayed as fold change to unstimulated control.

* p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001

Primary murine vascular cells

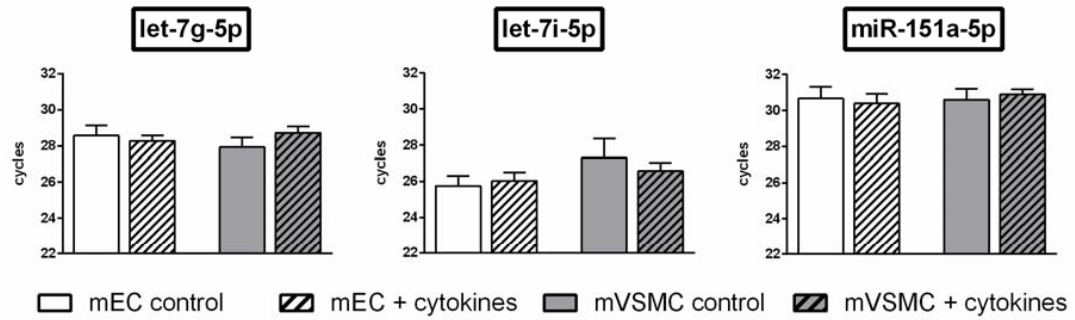


Figure S3: Expression rates of let-7g-5p, let-7i-5p, and miR-151a-5p in primary murine vascular cells. Murine endothelial cells (mEC) were isolated from murine mesenteries and vascular smooth muscle cells (mVSMC) from lungs of C57BL/6 mice. Cells were stimulated with a cytokine mix consisting of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ (each in a concentration of 5 ng/ml). Relative quantification of miRNA expression was performed by means of the miRCURY LNA SYBR Green PCR kit and appropriate miRCURY LNA miRNA PCR assay primers on a CFX96 Touch Real Time PCR detection system (N = 4, n = 2). miRNA expression is displayed as mean difference to unstimulated control on the basis of raw Ct values.

Table S1: Summary of miRNAs discussed as data normalizers in different human studies

Condition	miRNA	Source	Reference
Bladder cancer	miR-16-5p, miR-193a-5p	Serum	doi:10.3892/mmr.2015.3428
	miR-101, miR-125a-5p, miR-148b, miR-151-5p, miR-181b, miR-874	Tissue	doi:10.1371/journal.pone.0039309
Breast cancer	miR-16, miR-425	Blood	doi:10.1371/journal.pone.0083718
	let-7a, miR-16	Tissue	doi:10.1186/1471-2199-9-76
	miR-16-5p, miR-29a-3p	Tissue	doi:10.3390/ijms17020156
Cervical cancer	miR-23a, miR-191	Tissue	doi:10.3858/emm.2011.43.6.039
	miR-151-5p, miR-152-3p, miR-423-3p	Tissue	doi:10.1016/j.tranon.2018.12.010
Chronic kidney disease	miR-16	Urinary exosomes	doi:10.1371/journal.pone.0183435
Colorectal cancer	miR-191-5p	Serum	doi:10.1371/journal.pone.0083025
	miR-25-3p, miR-93-5p, miR-106b-5p	Serum	doi:10.1038/srep35611
	let-7g, miR-27a, miR-193a-5p	Tissue	doi:10.1371/journal.pone.0150593
	miR-16, miR-345	Tissue	doi:10.1186/1471-2407-10-173
	miR-345, miR-520d, miR-1228	Tissue, plasma, exosomes	doi:10.1038/s41598-017-08784-3
Diffuse large B-cell lymphoma	miR-24	Tissue	doi:10.1136/jclinpath-2012-201021
Dihydrotestosterone treatment	miR-16, miR-1228-3p	Prostate cells lines RWPE-1, LNCaP, 22RV1, DU145, PC-3	doi:10.1038/s41598-018-19458-z
Esophageal cancer	miR-28-5p, miR-34a-5p, miR-186-5p	Tissue	doi:10.1007/s12032-016-0860-7
Gastric cancer	miR-16, miR-93	Serum	doi:10.1007/s10620-011-1981-7
	miR-101-3p, miR-140-3p	Tissue	doi:10.1016/j.gene.2017.04.016
Heart failure / hypertension	let-7i, miR-16	Serum	doi:10.21037/jtd.2018.04.128
Hepatitis B	miR-22*, miR-26a, miR-221	Serum	doi:10.1007/s12033-011-9414-6
	miR-24-3p, miR-151a-5p, miR-425-5p	Cell line HepG2	doi:10.1186/s13104-016-1848-2
Kidney cancer	miR-28, miR-103, miR-106a	Tissue	doi:10.1016/j.ab.2011.06.009
Low/high estrogen levels	miR-188-5p, miR-222-3p	Plasma	doi:10.1186/s13104-017-2636-3
Lung cancer	miRNA-192	Pleural effusion	doi:10.3892/ol.2014.2404
Major depressive disorder	miR-93-5p, miR-101-3p	Plasma	doi:10.1016/j.jad.2013.12.035
Neuronal differentiation	miR-26b, miR-103, miR-106b	Cell lines SK-N-BE(2)C, neuro-2a, NG108-15, PC12; ENStem-A neural progenitor cells	doi:10.1016/j.neuroscience.2011.10.024
Ovarian cancer	miR-191-5p	Tissue	doi:10.1111/jcmm.12927
Prostate cancer	miR-191	Urine sediments	doi:10.1155/2015/973597
	miR-130b	Tissue	doi:10.3858/emm.2010.42.11.076
Stable coronary artery disease	miR-4516, miR-6090	Plasma	doi:10.5603/CJ.2016.0109
Thyroid cancer	miR-99a-5p, miR-151a-3p, miR-197-3p, miR-214-3p	Aspiration smears	doi:10.3892/or.2016.5113
Training status	miR-320d	Plasma	doi:10.1038/s41598-019-38505-x
Vulvar cancer	miR-93-5p, miR-425-5p	Plasma	doi:10.1177/1010428317717140

OPEN

Author Correction: Identification of stably expressed housekeeping miRNAs in endothelial cells and macrophages in an inflammatory setting

Fabian Link¹, Knut Krohn² & Julia Schumann¹Correction to: *Scientific Reports* <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49241-7>, published online 04 September 2019

The Acknowledgements section in this Article is incomplete.

“The authors wish to thank Claudia Rößler, Anja Leimert and Melanie Cieselski for their great assistance in cell culture and RNA isolation. Special thanks to the Hans Böckler Foundation that supported this work by a scholarship (Grant number 394216).”

Should Read:

“The authors wish to thank Claudia Rößler, Anja Leimert and Melanie Cieselski for their great assistance in cell culture and RNA isolation. Special thanks to the Hans Böckler Foundation that supported this work by a scholarship (Grant number 394216). We acknowledge the financial support within the funding program Open Access Publishing by the German Research Foundation (DFG).”



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

¹Clinic for Anaesthesiology and Operative Intensive Care, University Hospital Halle (Saale), Halle, Saale, Germany.

²Core Unit DNA Technologies, Medical Faculty, Leipzig University, Leipzig, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.S. (email: julia.schumann@uk-halle.de)

Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbstständigkeitserklärung

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

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

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

Halle (Saale), Datum

Fabian Link

Danksagung

Für die zur Erstellung dieser Arbeit unbedingt notwendige Unterstützung bedanke ich mich bei

- meiner Frau und meiner Familie, die mich in allen Bearbeitungsphasen unterstützt und motiviert haben;
- der Hans-Böckler-Stiftung, die mit ihrer Förderung die Erstellung einer Arbeit dieses Umfangs für mich erst ermöglichten;
- den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Julius-Bernstein-Instituts für die Bereitstellung der Laborplätze und Geräte;
- den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im ärztlichen und pflegerischen Bereich der anästhesiologischen Intensivstation für ihre Mitwirkung bei der Probandenakquise;
- Frau Anja Leimert für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in die Arbeitsabläufe im Labor;
- zuletzt, jedoch in besonderem Maße Frau Dr. Julia Schumann für die herausragende und wertschätzende Betreuung während der vergangenen Jahre, die maßgeblich zum erfolgreichen Verlauf dieser Forschungsarbeit beigetragen hat.