
Zirkulierende Exosomen und deren microRNA-Gehalt bei Pneumonie und Sepsis

Hanna Hildegard Goebel



München 2025

Aus der
Klinik der Anaesthesiologie
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Bernhard Zwißler

**Zirkulierende Exosomen und
deren microRNA-Gehalt bei
Pneumonie und Sepsis**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hanna Hildegard Goebel

aus
Böblingen

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Gustav Schelling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Hartl

Mitbetreuung durch den Dr. Florian Brandes
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.10.2025

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis.....	10
1 Einleitung	12
1.1 Die Pneumonie.....	12
1.2 Die Sepsis und der septische Schock	17
1.3 Extrazelluläre Mikrovesikel	28
1.3.1 Exosomen	30
1.4 Die microRNA	34
1.5 MiRNAs und Exosomen	38
1.6 Fragestellung	42
1.7 Zielsetzung.....	43
2 Material und Methoden.....	44
2.1 Studiendesign und Teilnehmerkollektiv	44
2.2 Molekulargenetische Untersuchung	46
2.2.1 Extraktion der Exosomen	47
2.2.2 Extraktion der miRNA.....	51
2.2.3 Hochdurchsatzsequenzierung	52
2.3 Statistische Analyse	53
3 Ergebnisse	56
3.1 Studienkollektiv	56
3.1.1 Statistik der demografischen Daten.....	60
3.1.2 Klinische Parameter Pneumonie vs. Sepsis	63
3.1.3 Klinischer Verlauf der Sepsispatienten	66
3.2 Probenausbeute.....	71
3.2.1 miRNAs.....	71

3.2.2	Statistische Auswertung der miRNAs	86
4	Diskussion.....	111
4.1	Limitationen in Bezug auf Material und Methoden	111
4.2	Diskussion der Ergebnisse	119
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	152
6	Literaturverzeichnis	156
	Danksagung	175

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Der CURB-65-Score und seine klinische Relevanz.....	15
Abbildung 2. Flussdiagramm zur Diagnostik einer Sepsis und eines septischen Schocks.	20
Abbildung 3. APACHE II-Score.	21
Abbildung 4. SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II).	22
Abbildung 5. Der MODS und die Sterblichkeitsrate.	24
Abbildung 6. AKI-Stadien sowie AKIN- und RIFLE-Kriterien.	26
Abbildung 7. Schematische Darstellung der Entstehung von Mikrovesikel, Exosomen und Apoptotische Körper.	29
Abbildung 8. Schematische Darstellung der Mikrovesikel- und Exosomenbiosynthese.	31
Abbildung 9. Die Synthese der miRNAs.	35
Abbildung 10. Interaktion von Exosomen mit ihrer Empfängerzelle.	40
Abbildung 11. Altersverteilung des Studienkollektivs.	60
Abbildung 12. Komorbiditäten der Pneumonie und Sepsisgruppe.	62
Abbildung 13. Pneumonie vs. Sepsis: Leukozyten und Procalcitonin an Tag 0.	64
Abbildung 14. Pneumonie vs. Sepsis: CRP und IL-6 an Tag 0.	65
Abbildung 15. Verlauf der Entzündungswerte Leukozyten, CRP und PCT bei Sepsis in den ersten 21 Tagen.	67
Abbildung 16. Verlauf des IL-6-Wertes bei Sepsis in den ersten 21 Tagen.....	68
Abbildung 17. Verlauf der Laktatwerte bei Sepsis in den ersten 21 Tagen.	68
Abbildung 18. Verlauf SOFA-, APACHE II-Score und MODS bei Sepsis.....	70
Abbildung 19. Log2 Fold Change der signifikant veränderten miRNAs zwischen ambulant erworbener Pneumonie und Volunteers.....	73
Abbildung 20. Log2FoldChange der signifikant veränderten miRNAs zwischen Patienten mit Sepsis und gesunden Probanden (Volunteers).....	76
Abbildung 21. Log2FoldChange der signifikant veränderten miRNAs zwischen Patienten mit septischen Schock und gesunden Probanden (Volunteers).....	79
Abbildung 22. Log2Fold Change der signifikant veränderten miRNAs zwischen Volunteers und ambulant erworbener Pneumonie.....	81

Abbildung 23. Log2 Fold Change der signifikant veränderten miRNAs zwischen Sepsis und Pneumonie.	83
Abbildung 24. Log2FoldChange der signifikant veränderten miRNAs zwischen Patienten mit septischen Schock und Pneumoniepatienten.	85
Abbildung 25. ROC und AUC der let-7e-5p und das Auftreten einer AKI bei Sepsis.....	108
Abbildung 26. ROC und AUC der miR-500a-3p und den Einsatz einer Nierenersatztherapie bei Sepsis.....	109
Abbildung 27. ROC und AUC der miRNAs und kombinierten Sepsis-Scores.	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Diagnosekriterien einer schweren ambulant erworbenen Pneumonie.	16
Tabelle 2. Der SOFA-Score.....	19
Tabelle 3. Übersicht der verschiedenen Typen eukaryotischer zellulärer Vesikel.	28
Tabelle 4. Patientendaten der Studienkohorten.....	59
Tabelle 5. Die 27 signifikant regulierten miRNAs zwischen Patienten mit einer ambulant erworbenen Pneumonie und gesunden Probanden (Volunteers).....	72
Tabelle 6. Die 66 signifikant regulierten miRNAs zwischen Patienten mit einer Sepsis und gesunden Probanden (Volunteer).....	75
Tabelle 7. Die 78 signifikant regulierten miRNAs zwischen Patienten mit einem septischen Schock und gesunden Probanden (Volunteer).	78
Tabelle 8. Die 29 signifikant regulierten miRNAs zwischen Volunteers und ambulant erworbener Pneumonie.	80
Tabelle 9. Die 25 signifikant regulierten miRNAs zwischen Sepsis und ambulant erworbener Pneumonie.....	82
Tabelle 10. Die 26 signifikant regulierten miRNAs zwischen Patienten mit einem septischen Schock und Pneumoniepatienten.	84
Tabelle 11. Signifikant veränderte miRNAs bei Volunteer vs. Pneumonie und Pneumonie vs. Volunteer.....	87
Tabelle 12. Korrelation signifikanter miRNAs (Pneumonie vs. Volunteers) mit klinischen Parametern der Pneumoniegruppe.....	89
Tabelle 13. Regressionsanalyse der miRNAs und der klinischen Parameter der Pneumoniepatienten.....	93
Tabelle 14. Korrelationen zwischen miRNAs und klinischen Parametern der Sepsispatienten.	96
Tabelle 15. Korrelation zwischen miR-93-5p und dem Versterben der Sepsispatienten während der Studie.	97
Tabelle 16. Korrelation zwischen miRNAs und Entzündungs- und Gerinnungsparameter, sowie Katecholaminbedarf bei Sepsispatienten.....	98
Tabelle 17. Korrelationen der signifikant regulierten miRNAs zwischen Sepsis und ambulant erworbener Pneumonie in Zusammenhang mit Nierenretentionsparametern.	100

Tabelle 18. Korrelation der signifikant regulierten miRNAs zwischen ambulant erworbener Pneumonie und Sepsis in Zusammenhang mit Nierenfunktionseinschränkungen und Nierenersatztherapie.	101
Tabelle 19. Regressionsanalyse der korrelierenden miRNAs mit den klinischen Parametern von Sepsispatienten.	104
Tabelle 20. Binär logistische Regressionsanalyse der korrelierenden miRNAs mit dem Auftreten einer akuten Nierenschädigung, dem Einsatz einer Nierenersatztherapie und kombinierten Sepsis-Scores.	106
Tabelle 21. Auszug unserer signifikant veränderten exprimierten miRNAs bei Pneumonie gegenüber gesunden Probanden mit Interpretation.	121
Tabelle 22. Auswahl einiger signifikant regulierten miRNAs in unserer Pneumoniekohorte in der Literatur.	126
Tabelle 23. Auszug bei Sepsis veränderter miRNAs gegenüber Pneumonieklienten mit Interpretation.	133
Tabelle 24. Auswahl unserer signifikant veränderten exprimierten miRNAs bei Sepsis gegenüber Pneumonieklienten in der Literatur.	151

Abkürzungsverzeichnis

r_s	Spearman-Rho Korrelationskoeffizient
Abk.	Abkürzung
ACE	<i>engl.</i> Angiotensin Converting Enzyme
AKI	<i>engl.</i> Acute lung injury
Anm.	Anmerkung
APACHE II	<i>engl.</i> Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II
BMI	Body-Mass-Index
CAP	<i>engl.</i> Community-acquired pneumonia (ambulant erworbene Pneumonie)
CCD	<i>engl.</i> charge-coupled device
cDNA	<i>engl.</i> complementary DNA (komplementäre DNA)
CRP	C-reaktives Protein
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DEG	<i>engl.</i> differentially expressed gene (differentiell exprimiertes Gen)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECMO	<i>engl.</i> Extracorporeal membrane oxygenation
ECV	<i>engl.</i> extracellular vesicles (extrazelluläre Vesikel)
exRNA	exosomale RNA
GCS	<i>engl.</i> Glasgow Coma Scale
IL	Interleukin
ILV	Intraluminale Vesikel
IQR	<i>engl.</i> Interquartil Range (Interquartilabstand)
ITS	Intensivstation
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MAP	Mittlerer arterieller Druck
miRNA	<i>engl.</i> Micro Ribonucleic acid
MODS	<i>engl.</i> Multiple organ dysfunction score
MOV	Multiorganversagen
MVB	<i>engl.</i> multivesicular bodies (multivesikuläre Körper)
MVK	Multivesikuläre Körper
NTA	<i>engl.</i> Nano Tracking Analysis
Nt	Nukleotide
PAGE	<i>engl.</i> polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphat-gepufferter Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCT	Procalcitonin
qSOFA	quick SOFA
RT-qPCR	<i>engl.</i> Reverse Transcription-quantitative PCR
SAPS II	<i>engl.</i> Simplified Acute Physiology Score II
SD	<i>engl.</i> Standard Deviation (Standardabweichung)
SDS	<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate

SOFA	<i>engl.</i> Sequential (sepsis-related) Organ Failure Assessment
TEM	<i>engl.</i> Transmission electron microscopy

1 Einleitung

1.1 Die Pneumonie

Die Pneumonie ist definiert als eine infektiöse oder inflammatorische Entzündung des alveolären und/oder des interstitiellen Lungenparenchyms.¹ Diese Entzündungsreaktion kann zu perivaskulären und interstitiellen Ödemen mit Rekrutierung von Entzündungszellen führen, welche als Folge eine Beeinträchtigung der Membranpermeabilität mit Gasaustauschstörungen in der Lunge haben kann.² Die Pneumonie ist eine relevante Erkrankung: Jährlich gibt es weltweit etwa 450 Millionen Fälle, worunter etwa 4 Millionen Menschen versterben. Dies macht sie zu einer den 10 häufigsten Todesursachen.^{3, 4} Folgende Ergebnisse unterstreichen die epidemiologische Relevanz: Eine Auswertung von Krankenkassendaten in Deutschland ergab eine Inzidenz der ambulant erworbenen Pneumonie (s.u.) von 9,7 pro 1 000 Patientenjahre (entsprechend mehr als 660 000 Patienten/Jahr), eine Hospitalisierungsrate von 46,5% und eine Gesamt-30-Tage-Letalität von 12,9%. Zusätzlich zeigen stationär aufgenommene Patienten gegenüber ambulant geführten eine höhere Letalitätsrate.⁵

Man kann die Pneumonie aufgrund ihrer Ätiologie in verschiedene Gruppen einteilen: ambulant oder nosokomial erworbene, die Pneumonie bei Immunsupprimierten oder die beatmungsassoziierte Pneumonie.^{1, 6}

Risikofaktoren, an einer ambulant erworbenen Pneumonie (*CAP, community-acquired pneumonia*) zu erkranken, sind ein zunehmendes Lebensalter, das männliche Geschlecht, Nikotinabusus sowie eine Kombination von chronischen Komorbiditäten wie neurologische oder respiratorische Vorerkrankungen.^{5, 7}

Die ambulant erworbene Pneumonie wird von der nosokomialen Pneumonie (*HAP, hospital-acquired pneumonia*) unterschieden. Die HAP ist definiert durch eine nach >48 Stunden auftretende Pneumonie nach Krankenhausaufnahme oder bei Patientinnen und Patienten*, bei denen der letzte Krankenhausaufenthalt bis zu 3 Monaten zurückliegt.⁶

Des Weiteren gibt es die Pneumonie bei schwer immunsupprimierten Patienten (*pneumonia in the immunosuppressed host*), wobei hier nicht zwischen einer ambulanten oder nosokomialen Pneumonie unterschieden wird. Vielmehr ist das zu erwartende Erregerspektrum bei der zugrundeliegenden Erkrankung von Bedeutung. Beispiele einer schweren Immunsuppression ist ein Zustand nach Transplantation solider Organe oder Stammzellen, Antikörpermangelsyndrome oder eine Neutropenie (< 1 000/ μ L Neutrophile).⁶

* In der folgenden Arbeit wird zur besseren Lesbarkeit lediglich die männliche Form verwendet. Es sei darauf hingewiesen, dass stets alle Geschlechter gemeint sind, sofern nicht ausdrücklich anders geschrieben.

Der Einteilung hinzukommend, ist die beatmungsassoziierte Pneumonie bei künstlich beatmeten Patienten. Diese weisen ein ihrer Grunderkrankung und Behandlung angepasstes Erregerspektrum auf.¹

Häufige bakterielle Erreger der infektiösen Pneumonie sind *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus*.^{6, 8} Bis zu ein Drittel aller ambulant erworbenen Pneumonien des Erwachsenen können viral bedingt sein, häufige Erreger sind Influenza-, respiratorische Synzytial-, Parainfluenza- und Adenoviren.³ Seltener Ursachen können Infektionen mit Pilzen sein. Häufig gelingt jedoch eine eindeutige ätiologische Zuweisung nicht und wird durch das mögliche gleichzeitige Vorliegen mehrerer Erreger oder Ko-Infektionen erschwert.^{3, 6}

Die Diagnostik einer Pneumonie wird im Folgenden kurz erläutert. An erster Stelle steht die Anamnese mit dem Erfragen von Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit, Gliederschmerzen, Diarrhoe und Fieber. Insbesondere bei älteren Patienten ist auf eine Veränderung der Vigilanz sowie Orientierung zu achten. Atemwegssymptome wie Dyspnoe, Husten mit und ohne Auswurf sowie atemabhängige thorakale Schmerzen können auftreten. Bei der nachfolgenden körperlichen Untersuchung ist auf eine Dyspnoe, Tachypnoe, Tachykardie, sowie bei der Perkussion und Auskultation der Lungen auf einen abgeschwächten Klopfschall und auskultatorische Rasselgeräusche zu achten. An dieser Stelle können zur weiteren Verlaufs- und Therapieplanung Scores wie der CRB-65 oder CURB-65 (s.u. und Abbildung 1) sowie Laborparameter genutzt werden. Zur definitiven Diagnosestellung einer (ambulant) erworbenen Pneumonie bedarf es eines radiologischen Nachweises eines neu aufgetreten Infiltrates im Lungengewebe, meist in Form einer Röntgen-Thorax-Aufnahme. Bei negativem Befund, aber deutlichen anamnestischen und klinischen Symptomen, ist die Diagnose allerdings nicht zu verwerfen.⁶

Mit der Blutabnahme werden diagnostische Parameter wie ein Blutbild mit Leukozyten und Thrombozyten, Entzündungsparameter wie das C-reaktive Protein (CRP) und Procalcitonin (PCT), Elektrolyte und ggfs. Werte zur Evaluierung der Nieren- und Leberfunktion erfasst.⁶ Gerade das CRP und PCT sind Biomarker, die zu einer, in gewissem Maße, Differenzierung zwischen bakterieller und nicht-bakterieller Pathogenese herangezogen werden können.¹ Das PCT ist ein Vorläuferpeptid des Hormons Calcitonin und steigt bei bakteriellen Infektionen schnell an. Es korreliert mit der Schwere einer Infektion, beispielsweise bei einer Pneumonie-induzierten Sepsis. Es ist weiterhin ein dynamischer Parameter, der innerhalb von 6-12 Stunden nach Beginn einer Infektion steigen kann, bei Wirkung der antibiotischen Therapie sinkt und bei Verschlechterung des Patientenzustandes (wieder) ansteigen kann.^{1, 3, 9} Das CRP ist ein in der Leber gebildetes Akut-Phase-Protein, das als Reaktion auf eine Inflammation, Infektion oder einen Gewebsschaden ansteigt. Es hat eine niedrige Spezifität und steigt zwar innerhalb von 4-6 Stunden nach einem Ereignis an, kann aber beispielsweise

auch im Rahmen von rheumatologischen Erkrankungen erhöht sein.^{1,9} In der aktuellen Version der amerikanischen Leitlinie (2019) wird die Höhe des gemessenen PCT nicht zur Entscheidungsfindung zum Ansetzen einer antibakteriellen Therapie empfohlen, stattdessen sollte die Indikation anhand der klinischen Symptome und der radiologischen Ergebnisse gestellt werden.⁸ Gemäß der deutschen Leitlinie sollte zur Verlaufsbeurteilung bei Aufnahme und nach 3-4 Tagen das CRP oder PCT bestimmt werden.⁶

Eine routinemäßige Abnahme einer Sputum- und Blutkultur sollte Patienten mit schweren Pneumonien (nach *American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America* Kriterien) bzw. hospitalisierten und Risikopatienten für resistente Erreger vorbehalten sein.^{6,8} Bei Hinweisen in der Anamnese oder in der klinischen Untersuchung auf atypische bakterielle, sowie nicht-bakterielle Erreger, sollten entsprechende weiterführende leitliniengerechte diagnostische Verfahren eingeleitet werden.^{6,8}

Zur Einschätzung der Mortalität eines Patienten, der sich mit einer ambulant erworbenen Pneumonie in der Notaufnahme oder in der Hausarztpraxis präsentiert, sowie zur Evaluierung des weiteren Vorgehens, wird der CURB-65 bzw. der nur durch anamnestische und klinische Parameter erhobene CRB-65-Score angewendet. Dieser besteht aus 5 bzw. respektiv 4 Parametern, für die es jeweils einen Punkt gibt. Anhand der Punktzahl lassen sich drei verschiedenen Gruppen mit unterschiedlichem Mortalitätsrisiken ableiten (vgl. Abbildung 1).^{6,10} Mit einem Anstieg des CURB-65 Scores steigt die Mortalitätsrate während eines stationären Aufenthaltes.¹ Der CRB-65 (Bewusstseinseintrübung, Atemfrequenz $\geq 30/\text{min}$, Blutdruck systolisch $< 90 \text{ mmHg}$ bzw. diastolisch $\leq 60 \text{ mmHg}$ und das Alter ≥ 65 Jahre) kann schnell und vor Einleitung invasiver Diagnostik erhoben werden.⁶ Für den CURB-65 wird zusätzlich über eine Blutabnahme der Harnstoffwert bestimmt.¹⁰ Wenngleich zur Entscheidungsfindung, ob ein Patient ambulant oder stationär behandelt werden sollte, ein besserer Score verwendet werden kann (bspw. der PSI (*Pneumonia Severity Index*)) der von der amerikanischen Leitlinie eher empfohlen wird, so ist dessen Komplexität und schwierigere Erhebung nicht immer in der Praxis realisierbar. Deswegen kann laut Leitlinie der *American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America* der CURB-65 genutzt werden.⁸

Für die Einschätzung wie intensiv ein stationär aufgenommener Patient überwacht werden sollte (Normalstation, Überwachungs- oder Intensivstation), wird die Verwendung von Diagnosekriterien empfohlen (s. Tabelle 1).^{6,8} Bei Vorliegen von ≥ 3 der 9 Minor Kriterien oder ≥ 1 Major Kriterium, sollte eine intensivmedizinische Betreuung in Erwägung gezogen werden.⁸ Bei Hinweisen eines vorliegenden septischen Schocks bzw. einer Hypoperfusion (≥ 1 Major Kriterium) sollte sowohl eine initiale sowie im Verlauf wiederholende Laktatbestimmung erfolgen.⁶

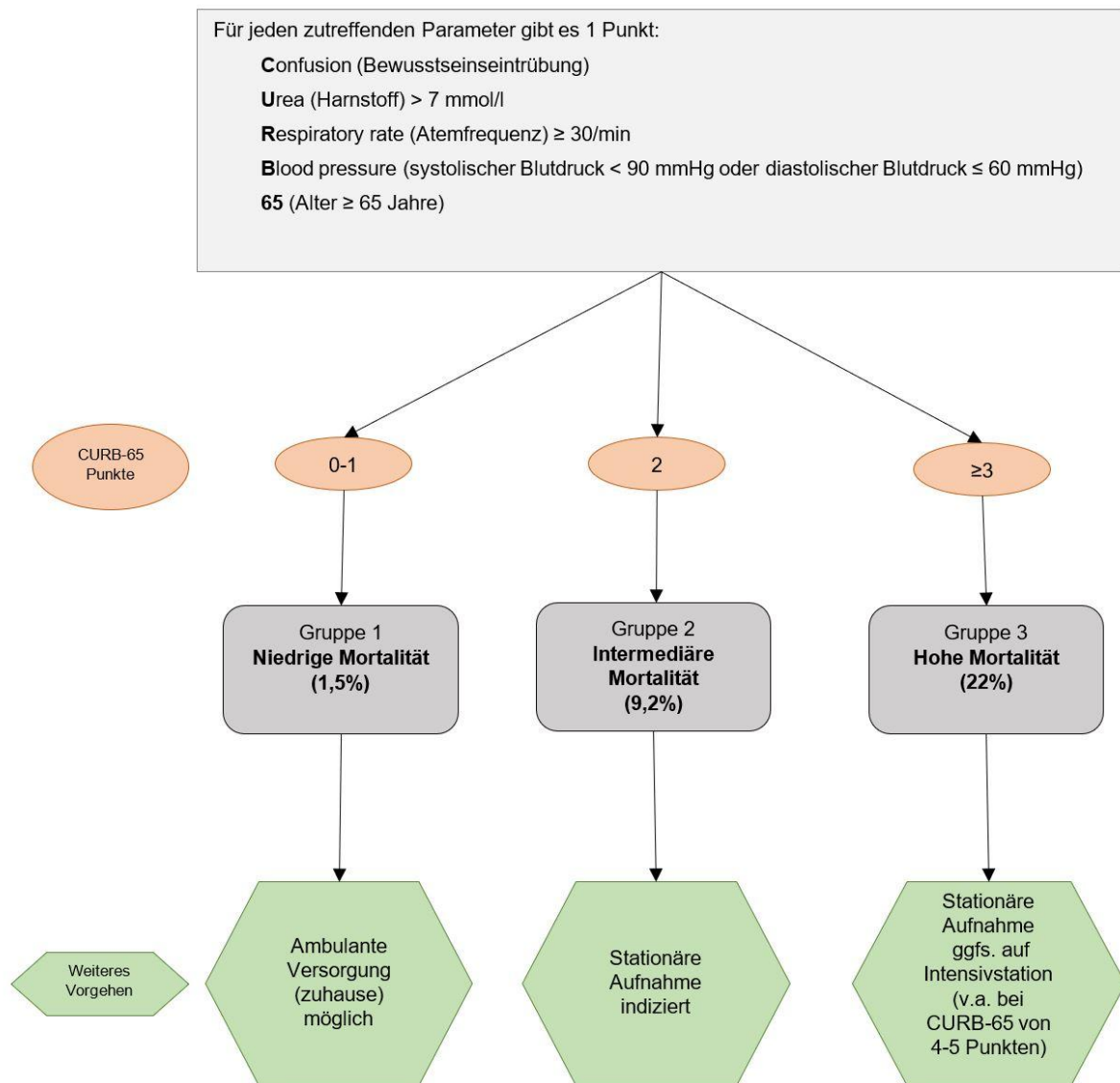


Abbildung 1. Der CURB-65-Score und seine klinische Relevanz. Abgebildet ist ein Flussdiagramm mit dem die Schwere einer Pneumonie eingeschätzt, sowie die weitere Versorgung geplant werden kann. Es werden insgesamt 5 Parameter erhoben, für die es bei Zutreffen jeweils einen Punkt gibt. Ab 2 Punkten ist eine stationäre Behandlung indiziert und ab 3 Punkten sollte eine intensivmedizinische Behandlung erwogen werden. Abbildung in Anlehnung an Lim und van der Eerden et al.¹⁰

Major Kriterien	1. Septischer Schock mit Bedarf an Vasopressoren 2. Respiratorische Insuffizienz, die eine mechanische Beatmung erfordert
Minor Kriterien	1. Atemfrequenz ≥ 30 /min 2. $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$-Verhältnis ≤ 250 3. Multilobäre Infiltrate in der Bildgebung 4. Neu aufgetretene Verwirrung/Desorientierung 5. Urämie (Harnstoff-N im Blut ≥ 20 mg/dl) 6. Leukopenie* (Anzahl der weißen Blutkörperchen $< 4\,000$ Zellen/μL) 7. Thrombozytopenie (Anzahl der Thrombozyten $< 100\,000/\mu\text{L}$) 8. Hypothermie (Kerntemperatur $< 36^\circ\text{C}$) 9. Hypotonie, die eine aggressive Volumentherapie erfordert *nur durch eine Infektion verursacht, nicht z.B. durch eine Chemotherapie induziert
Eine schwere ambulant erworbene Pneumonie kann diagnostiziert werden, wenn ein Major oder ≥ 3 Minor Kriterien zutreffen.	

Tabelle 1. Diagnosekriterien einer schweren ambulant erworbenen Pneumonie. Laut Metlay und Waterer et al.⁸

Therapeutisch wird bei einer (vermuteten) bakteriellen Pneumonie eine kalkulierte empirische Antibiotikatherapie empfohlen.⁸ Die stationäre Therapie sollte unter ständiger (Re-) Evaluation der klinischen Stabilität geleitet werden. Eine klinische Stabilität umfasst eine Herzfrequenz $\leq 100/\text{min}$, eine Atemfrequenz $\leq 24/\text{min}$, einen systolischen Blutdruck ≥ 90 mmHg, eine Oxygenierung von $\text{pO}_2 \geq 60$ mmHg bzw. $\text{SaO}_2 \geq 90\%$ bei Raumluft oder unter Sauerstoffgabe bei Patienten mit Sauerstoffpflichtigkeit, eine Körpertemperatur $\leq 37,8^\circ\text{C}$, die gesicherte Nahrungsaufnahme sowie ein adäquater Bewusstseinszustand. Eine routinemäßige Röntgen-Thorax Verlaufskontrolle wird nicht empfohlen. Diese kann bei Patienten im Alter von > 65 Jahren, Nikotinabusus und/oder schwere Begleiterkrankungen zum Ausschluss von tumorösen oder nicht-infektiösen Verschattungen indiziert sein, sollte jedoch frühestens zwei Wochen nach Beendigung der Antibiotikatherapie durchgeführt werden. Bei ambulant geführten Patienten sollte eine klinische Re-evaluation innerhalb der ersten 48 (-72) Stunden nach Erstvorstellung erfolgen.^{6, 8}

Komplikationen einer ambulant erworbenen Pneumonie sind vielfältig. Pulmonal können parapneumonischen Ergüsse, Lungenabszesse oder Pleuraempyeme entstehen. Extrapulmonal sind u. a. kardiale (Myokardischämien, Herzrhythmusstörungen und/oder manifeste Herzinsuffizienzen) und zerebrovaskuläre Komplikationen beschrieben.⁶ Nicht zu vernachlässigen ist außerdem ein möglicher septischer Verlauf, entweder bereits zu Beginn oder im Verlauf der Erkrankung. Hierzu mehr im nachfolgenden Abschnitt.

1.2 Die Sepsis und der septische Schock

Das von Singer et al. 2016 erschienene Paper „*The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*“ hat die Definition und Diagnostik der Sepsis und des septischen Schocks grundlegend verändert. 1991 wurde erstmals eine Definition erarbeitet und 2001 wieder überarbeitet, doch der Wunsch nach einer einheitlichen, den Forschungserkenntnissen entsprechenden, Definition war groß.¹¹ Die neuste Ausgabe der internationalen Sepsis Leitlinien wurde 2021 unter der „Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021“¹² veröffentlicht.

Eine Sepsis ist eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine dysregulierte Immunantwort auf eine Infektion verursacht wird und sie ist zugleich einer der Haupttodesursachen kritisch kranker Patienten. Die Organdysfunktion ist ein komplexer pathobiologischer Prozess, der mit Störungen der Zellphysiologie und biochemischen Stoffwechselwegen einhergeht.^{11, 13} Millionen von Menschen sind jährlich von einer Sepsis betroffen, von denen einer von vier Menschen verstirbt, wenn nicht sogar mehr.¹⁴ Mehr als die Hälfte (57,2%) der Sepsis verursachenden Infektionen sind nosokomialen Ursprungs, wovon sich wiederum der Großteil auf Intensivstationen infiziert.¹⁵ Die häufigsten Infektionsherde finden sich im unteren Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenital-Trakt.¹⁵ Die Organdysfunktion lässt sich anhand des SOFA – Scores (Sequential (*früher Sepsis-related*) Organ Failure Assessment) quantifizieren und durch eine Veränderung von ≥ 2 Punkten definieren (s. Tabelle 2).^{11, 16} Mit diesem Score lassen sich sechs Organsysteme evaluieren: das respiratorische, kardiovaskuläre und hämatologische System, die Organfunktionen der Leber und Niere, sowie das zentrale Nervensystem. Ferreira und Bota et al. zeigen, dass unabhängig vom erstgemessenen Wert bei einer Erhöhung des SOFA-Scores in den ersten 48 Stunden nach Aufnahme auf einer Intensivstation, mit einer Sterblichkeitsrate von mindestens 50% zu rechnen ist.¹⁷ Allgemein ist zu sagen, je höher der Score, desto höher die Sterblichkeitsrate.^{11, 17, 18} Zur präklinischen, ambulanten sowie schnellen innerklinischen Risikostratifizierung einer möglichen Sepsis oder eines septischen Verlaufes einer Infektion mit entsprechendem schlechtem Outcome, wurde der qSOFA (quickSOFA) entwickelt. Erfüllen Patienten mindestens 2 der folgenden Kriterien, ist eine Sepsis wahrscheinlich: Atemfrequenz $\geq 22/\text{min}$, neue Bewusstseinsstörung und/oder systolischer Blutdruck von ≤ 100 mmHg.¹¹

Der septische Schock ist definiert als eine Unterform der Sepsis, bei der durch eine ausgeprägte zirkulatorische, zelluläre und metabolische Störung mit einer erhöhten Mortalität gegenüber einer alleinigen Sepsis zu rechnen ist.¹¹ Die Diagnostik des septischen Schocks bedarf einer zugrundeliegenden Sepsis (also Veränderung des SOFA-Scores ≥ 2 Punkten) mit einem zusätzlichem Katecholaminbedarf zur Aufrechterhaltung eines mittleren arteriellen

Drucks (MAP) von ≥ 65 mmHg, sowie einem Serumlaktat-Wert von > 2 mmol/l (> 18 mg/dl) bei Ausschluss einer Hypovolämie bzw. Durchführung einer adäquaten Volumentherapie.¹¹

Laktat ist kein direkter Messwert zur Beurteilung der Gewebepfusion. Es kann aber hinweisend auf eine Gewebshypoxie, eine beschleunigte aerobe Glykolyse durch vermehrte β -adrenerge Stimulation oder andere Ursachen (z.B. Leberschäden) sein. Unabhängig davon sind höhere Laktatspiegel mit einer höheren Mortalität assoziiert und dienen als unspezifischer Marker für metabolischen oder zellulären Stress.^{11, 19}

Häufige Erreger sind sowohl grampositive, gramnegative, als auch gemischte bakterielle Mikroorganismen. Es sollte jedoch immer das individuelle Risikoprofil des Patienten beachtet werden.^{14, 19} Ein Überblick über den Workflow der Diagnostik einer Sepsis und eines septischen Schocks gibt Abbildung 2. In deutschen Krankenhäusern ist nach der Sepsis-3 Definition aufgrund eines septischen Schocks mit einer Krankenhausletalität von 50,9% und einer Intensivstationsletalität von 44,3% zu rechnen.¹⁵ Weitere Quellen sprechen von einer Krankenhausmortalität von mehr als 40%.¹¹

Neben dem SOFA-Score gibt es auch noch weitere Klassifikationssysteme, um den Schweregrad und die Mortalitätsraten einer Erkrankung zu beschreiben. Ein Beispiel ist der APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II) – Score (s. Abbildung 3). Er wurde entwickelt, um die Sterblichkeitsrate verschiedener Krankheiten sowie die Erfolgsaussichten unterschiedlicher Therapien besser vergleichen zu können. Der APACHE II Score umfasst eine Reihe von 12 messbaren Parametern, sowie das Alter und die chronischen Vorerkrankungen eines Patienten. Die Punktzahl errechnet sich anhand der verschiedenen Gewichtung der einzelnen Variablen und ergibt ein Ergebnis zwischen 0 und 71 Punkten. In der Regel wird der Score mit den schlechtesten Werten der ersten 24 Stunden nach Aufnahme auf Intensivstation (ITS) berechnet. Aus dieser Punktzahl lässt sich die Sterbewahrscheinlichkeit für verschiedene Krankheiten prognostizieren.²⁰ Eine vereinfachte Variante des APACHE II Score ist der SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II) (s. Abbildung 4) mit einer Punktzahl zwischen 0 und 163. Hier werden insgesamt 17 Variablen erhoben: 12 klinische Parameter, das Alter, der Aufnahmegrund (elektiv chirurgisch, ungeplant chirurgisch oder medizinische Ursache) und mögliche Vorerkrankungen werden mit einbezogen (erworbene Immunsuffizienz, metastasierte Tumorerkrankung oder eine maligne hämatologische Erkrankung).²¹

Organsystem	Parameter	Punktezah				
		0	1	2	3	4
Lunge	PaO ₂ /FiO ₂ in mmHg (kPa)	≥ 400 (53,3)	< 400 (53,3)	< 300 (40)	< 200 (26,7) mit unterstützender Beatmung	< 100 (13,3) mit unterstützender Beatmung
Gerinnung	Thrombozytenzahl (x10 ³ /μL)	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Leber	Bilirubin in mg/dL (μmol/L)	< 1,2 (20)	1,2–1,9 (20–32)	2,0–5,9 (33–101)	6–11,9 (102–204)	≥ 12,0 (204)
Kardio-vaskulär	(± Katecholamine für mind. 1 Stunde)	MAP ≥ 70 mmHg	MAP < 70 mmHg	Dopamin < 5 μg/kg/min oder Dobutamin (jede Dosis)	Dopamin 5,1–15 μg/kg/min oder Epinephrin ≤ 0,1 μg/kg/min oder Norepinephrin ≤ 0,1 μg/kg/min	Dopamin > 15 μg/kg/min oder Epinephrin > 0,1 μg/kg/min oder Norepinephrin > 0,1 μg/kg/min
Zentrales Nervensystem	Glasgow Coma Scale	15	13–14	10–12	6–9	<6
Nieren	Kreatinin in mg/dL (μmol/L)	< 1,2 (110)	1,2–1,9 (110–170)	2,0–3,4 (171–299)	3,5–4,9 (300–440)	≥ 5 (440)
	Urinausscheidung in mL/Tag				< 500	< 200
Positiver SOFA: Ein Anstieg ≥ 2 Punkte spricht für eine Organdysfunktion. Hat der Patient keine bekannte Organdysfunktion (akut oder chronisch) vor Entwicklung einer Infektion, ist von einem SOFA = 0 auszugehen.						

Tabelle 2. Der SOFA-Score. Nach Singer et al.¹¹ und Vincent et al.¹⁶ Abk.: SOFA-Score: (Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment Score, PaO₂: Sauerstoffpartialdruck, FiO₂: Inspiratorische Sauerstoffkonzentration, MAP: mittlerer arterieller Druck

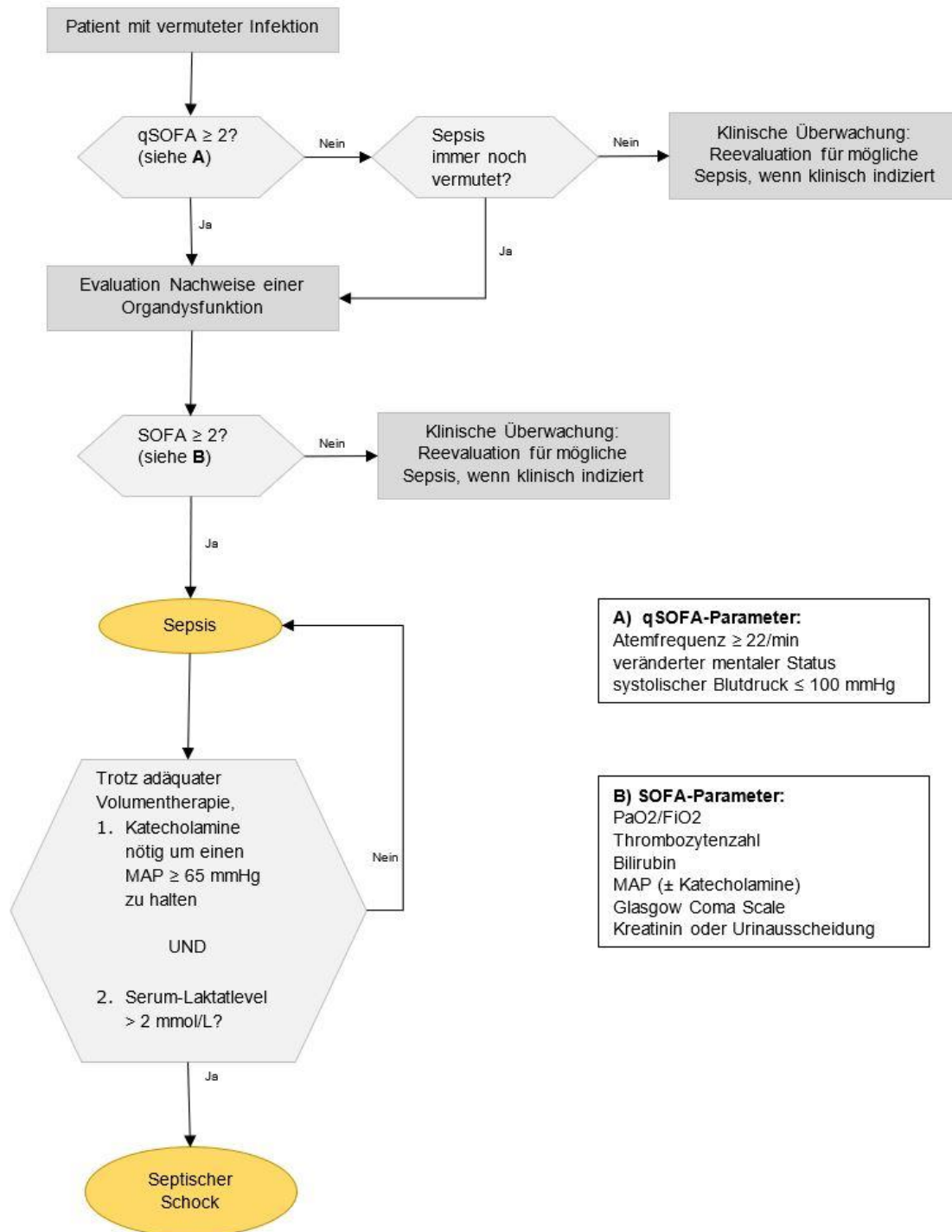


Abbildung 2. Flussdiagramm zur Diagnostik einer Sepsis und eines septischen Schocks. Ist bei einem Patienten keine vorbestehende (akute oder chronische) Organdysfunktion bekannt, ist von einem SOFA-Score = 0 auszugehen. Flussdiagramm in Anlehnung an Singer et al.¹¹ erstellt. Abk.: SOFA: Sequential (sepsis-related) Organ Failure Assessment, s. auch Tabelle 2; qSOFA: quick SOFA, MAP: mittlerer arterieller Blutdruck, PaO₂: Sauerstoffpartialdruck, FiO₂: Inspiratorische Sauerstoffkonzentration; PaO₂/FiO₂: Horovitz-Quotient

APACHE II = Acute Physiology Score (A) + Punkte für das Alter (B) + Punkte für chronische Erkrankungen (C)

(A) Acute Physiology Score (APS) Es werden jeweils die schlechtesten Werte der ersten 24 Stunden nach Aufnahme auf die Intensivstation verwendet		Abweichung nach oben					Abweichung nach unten			
		Punkte								
		+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temperatur rektal	°C	≥ 41	39-40,9		38,5 - 38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	≤ 29,9
Arterieller Mitteldruck	mmHg	≥ 160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤ 49
Herzfrequenz	/min	≥ 180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤ 39
Atemfrequenz (Beatmung oder Spontanatmung)	/min	≥ 50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤ 5
Oxygenierung										
wenn $\text{FiO}_2 \geq 0,5$	AaDO ₂ *	mmHg	≥ 500	350-499	200-349		< 200			
wenn $\text{FiO}_2 < 0,5$	PaO ₂	mmHg				> 70	61-70		55-60	< 55
Arterieller pH		≥ 7,7	7,6-7,69		7,5-7,59	7,33-7,49		7,25-7,32	7,15-7,24	< 7,15
Natrium im Serum	mmol/L	≥ 180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤ 110
Kalium im Serum	mmol/L	≥ 7	6-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3,0-3,4	2,5-2,9		< 2,5
Kreatinin im Serum (bei akutem Nierenversagen Punktzahl verdoppeln)	mg/dL	≥ 3,5	2,0-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		< 0,6		
Hämatokrit	%	≥ 60		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		< 20
Leukozyten	x1000 mm ³	≥ 40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		< 1
Glasgow Coma Scale (GCS)		Punktzahl = 15 - aktueller GCS								
Serum Bicarbonat (HCO ₃ ⁻)**	mmol/L (venös)	≥ 52	41-51,9		32-40,9	22-31,9		18-21,9	15-17,9	< 15

*AaDO₂ (Alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz) in mmHg = pAO₂ - paO₂ (alveolärer Sauerstoffpartialdruck - arterieller Sauerstoffpartialdruck) oder ablesen vom Blutgasanalyse-Gerät

** Nicht bevorzugt. Verwendung wenn keine arterielle Blutgasanalyse vorhanden

(B) Punkte für das Alter					
Alter	in Jahren	≤ 44	45 – 54	55 – 64	65 – 74
Punkte		0	2	3	5

(C) Chronic Health Score		
Operativer Status	Gesundheitsstatus	Punkte
Medizinische Ursache	In der Vorgeschichte finden sich eine Organinsuffizienz oder Immunschwäche*	+5
	Immunkompetent und ohne schwere Organinsuffizienz in der Vorgeschichte	+0
Postoperativer Patient nach Notfall-OP	In der Vorgeschichte finden sich eine Organinsuffizienz oder Immunschwäche	+5
	Immunkompetent und ohne schwere Organinsuffizienz in der Vorgeschichte	+0
Postoperativer Patient nach Elektiveingriff	In der Vorgeschichte finden sich Organinsuffizienz oder Immunschwäche*	+2
	Immunkompetent und ohne schwere Organinsuffizienz in der Vorgeschichte	+0

*Die Organinsuffizienz oder der immunsupprimierte Status müssen vor dem gegenwärtigen Krankenhausaufenthalt bekannt gewesen sein und einer der folgenden Kriterien entsprechen:

Leber	- Leberzirrhose (Biopsie gesichert) und portale Hypertension oder
	- Durch portale Hypertension ausgelöste obere gastrointestinale Blutung in der Vorgeschichte oder
	- Episoden hepatischer Insuffizienz, hepatische Enzephalopathie oder hepatischem Koma in der Vorgeschichte
Kardiovaskulär	- New York Heart Association Class IV
Pulmonal	- Chronische restriktive, obstruktive oder vaskuläre Erkrankungen einhergehend mit einer starken Einschränkung im Alltag (z. B. Unfähigkeit Treppen zu steigen oder den Haushalt zu führen) oder
	- Dokumentierte chronische Hypoxie, Hyperkapnie, erworbene Polyzythämie, schwere pulmonale Hypertension (> 40mmHg) oder
	- Abhängigkeit von einem Beatmungsgerät
Niere	- chronische Dialyse
Immunschwäche	- Der Patient hat eine Immunschwäche durch schwächende Therapie erhalten (z.B. Immunsuppression, Chemotherapie, Strahlentherapie, langfristige oder vor kurzem hochdosierte Steroidtherapie)
	- Erkrankungen, die mit einer Immunschwäche einhergehen (z. B. Leukämie, Lymphom, AIDS)

Auswertung: Minimum: 0 Punkte; Maximum: 71 Punkte							
Erreichte Punktzahl	0 – 4	5 – 9	10 – 14	15 – 19	20 – 24	25 – 29	30 – 34
Todesrate	≈ 4 %	≈ 8 %	≈ 15 %	≈ 25 %	≈ 40 %	≈ 55 %	≈ 75 %
medizinische Ursache	≈ 2 %	≈ 4 %	≈ 5 %	≈ 10 %	≈ 30 %	≈ 35 %	≈ 75 %
Todesrate postoperativ							≈ 85 %

Abbildung 3. APACHE II-Score. Nach Knaus et al.²⁰ Es werden aus den drei Kategorien A (Acute Physiology Score - APS), B (Alter) und C (chronische Erkrankungen) die Punkte addiert. Für den APS wird die Summe der Punktzahlen der 12 Parameter zusammengerechnet. Die Todesrate wird zwischen Patienten mit medizinischer Ursache und Patienten nach elektiven oder notfallmäßigen operativen Eingriffen unterschieden.

SAPS II = Acute Physiology Score (A) + Punkte für das Alter (B) +

Punkte für das chronische Leiden und den Aufnahmezustand (C)

(A) Acute Physiology Score (APS) Es werden jeweils die schlechtesten Werte der vergangenen 24 Stunden verwendet		Abnorm niedrige Werte				normal	Abnorm hohe Werte	
Parameter		(Punktzahl)						
Herzfrequenz	/min			<40 (11)	40-69 (2)	70 – 119 (0)	120-159 (4)	≥ 160 (7)
Systolischer Blutdruck	mmHg			< 70 (13)	70-99 (5)	100-199 (0)	≥ 200 (2)	
Körpertemperatur	°C					< 39,0 (0)	≥ 39,0 (3)	
Oxygenierung PaO ₂ /FiO ₂ (schlechtesten Wert für die Berechnung wählen) → nur im Falle einer maschinellen Beatmung oder kontinuierlichen pulmonal arteriellen Druckmessung	mmHg		<100 (11)	100- 199 (9)	≥200 (6)	-		
Ausfuhr Urin	L/24h			< 0,5 (11)	0,5- 0,99 (4)	≥ 1,0 (0)		
Harnstoff im Serum*	g/L (mmol/l)					< 0,60 (<10) (0)	6,0-1,79 (10,0 - 29,9) (6)	≥ 1,80 (≥ 30) (10)
Harnstoff-Stickstoff im Serum*	mg/dL					< 28 (0)	28-83 (6)	≥ 84 (10)
Leukozyten	x10 ⁹ /mm ³				< 1,0 (12)	1,0-19,9 (0)	≥ 20 (3)	
Natrium im Serum	mMol/L				<125 (5)	125-144 (0)	≥ 145 (1)	
Kalium im Serum	mMol/L				< 3 (3)	3,0-4,9 (0)	≥ 5,0 (3)	
Bicarbonat im Serum (niedrigsten Wert für die Berechnung wählen)	mMol/L			< 15 (6)	15-19 (3)	≥ 20 (0)		
Bilirubin im Serum	mg/dL					< 4,0 (0)	4,0-5,9 (4)	≥ 6,0 (9)
Glasgow Coma Scale (vor Sedierung)		< 6 (26)	6-8 (13)	9-10 (7)	11-13 (5)	14-15 (0)		

*Entweder Harnstoff oder Harnstoff-Stickstoff in die Berechnung einbeziehen

(B) Punkte für das Alter						
Punkte	0	7	12	15	16	18
Alter (in Jahren)	<40	40-59	60-69	70-74	75-79	≥80

(C) Punkte für das chronische Leiden und den Aufnahmezustand						
Parameter	Punkte					
	0	6	8	9	10	17
Chronische Leiden*				Neoplasie mit Metastase**	Maligne hämatologische Erkrankung***	AIDS (pos. HIV- Test und Komplikationen****)
Aufnahmestatus*	Elektiv chirurgisch	Medizinisch	ungeplant chirurgisch			

*Nur das chronische Leiden mit der höchsten Punktzahl wird gezählt.

** Eine Neoplasie mit Metastase muss durch eine Operation, Bildgebung oder andere Methode nachgewiesen sein.

*** Lymphom, Akute Leukämie oder Multiples Myelom

**** Komplikationen einer HIV-Erkrankung sind beispielsweise eine Pneumocystis carinii Pneumonie, das Kaposi Sarkom, ein Lymphom, eine Tuberkulose oder eine Toxoplasmose

* Aufnahmestatus:

- Elektiv chirurgisch: Operationstermin mind. 24 Stunden im Voraus geplant
- ungeplant chirurgisch: Operationstermin in den letzten 24 Stunden geplant
- Medizinisch: mind. Eine Woche lang nicht operiert.

Abbildung 4. SAPS II (Simplified Acute Physiology Score II). Nach Le Gall et al.²¹ Es werden aus den drei Kategorien A (Acute Physiology Score - APS), B (Alter) und C (chronische Erkrankungen) die Punkte addiert. Für den APS wird die Summe der Punktzahlen der 12 Parameter zusammengerechnet.

Ein weiteres Beispiel ist der MODS (Multiple Organ Dysfunction Score) (s. Abbildung 5), der zur besseren Objektivierung und Quantifizierung der Organfunktionsstörungen und -versagen entwickelt wurde.^{18, 22} Das Multiorganversagen (MOV) ist eines der Hauptursachen für die Morbidität und Mortalität von Patienten auf Intensivstationen, denn etwa 20-50% der Sepsispatienten sterben an den Folgen eines MOV.¹³ Dieser Score ermöglicht nicht nur ein Vergleich von Patientengruppen, sondern auch eine Verlaufsbeobachtung während der intensivmedizinischen Behandlung.¹⁸ Wenngleich der MODS eine vergleichbare Vorhersagekraft wie der SOFA-Score hat, so unterscheiden sie sich vor allem in der Beurteilung der kardiovaskulären Funktion bzw. kreislaufunterstützenden Therapie. Der SOFA-Score bezieht als Parameter den MAP (mittlerer arterieller Druck) bzw. den Gebrauch von vasopressiven Substanzen mit ein. Der MODS hingegen benutzt die PAR (*engl.* pressure adjusted heart rate). Diese errechnet sich aus dem Produkt von Herzfrequenz und dem Quotienten aus zentralvenösem Druck (ZVD) und MAP, womit er keine Angabe zur kreislaufunterstützenden Therapie erfordert.¹⁸

Multi Organ Dysfunction Score (MODS)

Organsystem	Parameter		Punktzahl				
			0	1	2	3	4
Lunge	PaO ₂ /FiO ₂	mmHg	> 300	226-300	151-225	76-150	≤ 75
Niere	Serum-Kreatinin	mg/dL	≤ 1,1	1,2-2,2	2,3-3,9	4-5,6	≥ 5,7
Leber	Serum-Bilirubin	mg/dL	≤ 1,2	1,3-3,5	3,6-7	7-14	>14
Kardiovaskulär	PAR*		≤ 10	10,1-15	15,1-20	20,1-30	>30
Hämatologie	Thrombozytenzahl	x10 ³ /mm ³	> 120	81-120	51-80	21-50	≤ 20
Neurologie	Glasgow Coma Scale		15	13-14	10-12	7-9	≤ 6

mögliche Punktzahl: minimal 0, maximal 24

zentralvenöser Druck (ZVD)

*PAR (pressure adjusted heart rate) = Herzfrequenz x $\frac{\text{zentralvenöser Druck (ZVD)}}{\text{mittlerer arterieller Druck (MAP)}}$

Punktzahl	Intensivstationssterblichkeit (in %)	Krankenhaussterblichkeit (in %)
0	0	0
1-4	1-2	7
5-8	3-5	16
9-12	25	50
13-16	50	70
17-20	75	82
21-24	100	100

Sterblichkeitsrate nach MODS

Abbildung 5. Der MODS und die Sterblichkeitsrate. Tabelle des Multi Organ Dysfunction Score (MODS) nach Peres et al.¹⁸ und Tabelle der Sterblichkeitsrate nach Marshall JC et al.²² Zur Berechnung des MODS werden die Punktzahlen der sechs Kategorien (Lunge, Niere, Leber, Kardiovaskulär, Hämatologie und Neurologie) addiert.

Die Niere ist ein lebenswichtiges Organ, welches im Rahmen einer Sepsis geschädigt werden kann. Das Auftreten einer akuten Nierenschädigung (AKI, acute kidney injury) ist unabhängig von der Ätiologie mit einer erhöhten Mortalität assoziiert.^{23, 24} Dabei ist die Sepsis mit bis zu 50% aller Fälle die häufigste Ursache einer AKI bei kritisch kranken Patienten, weshalb die Nierenfunktion bei Sepsispatienten engmaschig kontrolliert werden muss.²³ Das Auftreten einer AKI ist bei unserer Sepsiskohorte gemäß der KDIGO-Klassifikation von 2012²⁵ definiert:

- Anstieg des Serumkreatinin um $\geq 0,3\text{mg/dl}$ ($\geq 26,5\text{ }\mu\text{mol/l}$) innerhalb von 48 Stunden
ODER
- Anstieg des Serumkreatinin um das $\geq 1,5$ -fach des Ausgangswertes, welches nachgewiesen oder angenommen innerhalb der letzten 7 Tagen aufgetreten ist ODER
- Urinausscheidung $< 0,5\text{ ml/kg Körpergewicht/h}$ für mindestens 6 Stunden

Außerdem ist bei Erfüllen der AKIN- oder RIFLE-Kriterien (jedes Stadium bzw. Risk bis Failure) von einer AKI auszugehen (siehe Abbildung 6).

AKI-Stadien nach KDIGO-Kriterien 2012		
Stadium	Serumkreatinin	Urinausscheidung
1	1,5-1,9-facher Anstieg des Ausgangswertes ODER ≥ 0,3 mg/dl (bzw. 26,5 µmol/L) Anstieg	< 0,5 ml/kg KG/h für 6-12 Stunden
2	2,0-2,9-facher Anstieg des Ausgangswertes	< 0,5 ml/kg KG/h für ≥12 Stunden
3	3-facher Anstieg des Ausgangswertes ODER Anstieg des Serumkreatinins auf ≥ 4,0 mg/dl (bzw. 353,6 µmol/l) ODER Beginn einer Nierenersatztherapie ODER Bei Patienten < 18 Jahren Abfall der eGFR auf < 35 ml/min pro 1,73m ²	< 0,3 ml/kg KG/h für ≥ 24 Stunden oder Anurie für ≥ 12 Stunden

AKIN- Stadium		
Stadium	Serumkreatinin	Urinausscheidung
1	Anstieg um ≥ 0,3 mg/dl (bzw. 26,5 µmol/L) innerhalb von 48 Stunden ODER ≥ 1,5-2-facher Anstieg von Ausgangswert innerhalb von 7 Tagen	< 0,5 ml/kg KG/h für mehr als 6 Stunden
2	≥ 2-3-facher Anstieg von Ausgangswert innerhalb von 7 Tagen	< 0,5 ml/kg KG/h für mehr als 12 Stunden
3	> 3-facher Anstieg vom Ausgangswert ODER ≥ 4,0 mg/dl (bzw. 353,6 µmol/l) mit einem akuten Anstieg von mindestens 0,5 mg/dl (44 µmol/l) ODER Beginn Nierenersatztherapie	< 0,3 ml/kg KG/h für ≥ 24 Stunden oder Anurie für ≥ 12 Stunden

RIFLE		
Klassifikation	Serumkreatinin oder GFR	Urinausscheidung
Risk	Anstieg Kreatinin um das 1,5-fache ODER Abfall der GFR > 25%	< 0,5 ml/kg KG/h für mehr als 6 Stunden
Injury	Anstieg Serumkreatinin um das 2-fach ODER Abfall der GFR >50%	< 0,5 ml/kg KG/h für mehr als 12 Stunden
Failure	Anstieg Serumkreatinin um das 3-fache ODER > 4 mg/dl (> 354 µmol/L) mit einem akuten Anstieg von > 0,5 mg/dl (> 44 µmol/l) ODER Abfall der GFR > 75%	< 0,3 ml/kg KG/h für ≥ 24 Stunden oder Anurie für ≥ 12 Stunden
Loss	Anhaltendes akutes Nierenversagen = kompletter Ausfall der Nierenfunktion > 4 Wochen	
End-stage Kidney Disease	Endstadium Nierenschädigung, kompletter Ausfall der Nierenfunktion > 3 Monate	

Abbildung 6. AKI-Stadien sowie AKIN- und RIFLE-Kriterien. Die Einteilung in ein AKIN- oder RIFLE-Stadium erfolgt gemäß dem schlechtesten Wert (Serumkreatinin oder Urinausscheidung bzw. Abfall der GFR). Für die RIFLE Einteilung sollte die AKI innerhalb von 1-7 Tagen auftreten und mindestens für 24 Stunden anhalten. Tabelle nach der von Kellum et al. „KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury“ von 2012.²⁵ Abk.: AKI: acute kidney injury, GFR: Glomeruläre Filtrationsrate, KG: Körpergewicht

Die internationale Leitlinie zur Therapie der Sepsis und des septischen Schocks wurde 2016¹⁴ und in überarbeiteter Form im Jahre 2021¹² von der *Surviving Sepsis Campaign* (SSC) veröffentlicht. Die deutsche Version 2018 wurde u.a. von der Deutschen Sepsis Gesellschaft e. V.¹⁹ herausgebracht. Nähere Ausführungen zur Diagnose, Therapie und Nachsorge können oben genannten Quellen entnommen werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ersten Stunden einer Sepsistherapie entscheidend sind. Deswegen wurden von der SSC auch sogenannte Sepsisbündel entwickelt, die die wichtigsten therapeutischen Maßnahmen in den ersten 3 bzw. 6 Stunden erläutern. 2018 wurden diese noch einmal überarbeitet und zu einem 1-Stunden-Sepsisbündel zusammengefasst.²⁶ Dieses umfasst die Durchführung von fünf Maßnahmen innerhalb der ersten Stunde nach Erstdiagnose einer Sepsis oder eines septischen Schocks. Folgende Maßnahmen werden genannt:

- Messung des Serum-Laktats und Wiederholung bei einem Initialwert von > 2 mmol/L.
- Blutkulturdiagnostik vor Erstgabe einer antibiotischen Therapie.
- Gabe von Breitspektrumantibiotika.
- Rascher Beginn einer Volumentherapie von 30 ml/kg Körpergewicht bei Hypotension oder Serum-Laktat > 4 mmol/L.
- Gabe von Vasopressoren um einen MAP ≥ 65 mmHg aufrechtzuerhalten, wenn der Patient während oder nach der Volumentherapie hypotensiv ist.²⁶

1.3 Extrazelluläre Mikrovesikel

Der Terminus extrazelluläre Vesikel ist kein geschützter Begriff, weswegen es unterschiedliche Definitionen und Unterteilungen gibt. Hier ein kurzer Überblick der Nomenklatur.

Ein Vesikel ist ein kugelförmiges Partikel, welches von einer doppelschichtigen Phospholipidmembran umschlossen ist. Dabei variiert u.a. der Durchmesser, die Dichte, die Morphologie, die Proteinzusammensetzung und die subzelluläre Herkunft.²⁷ Anhand solcher Kriterien lassen sich verschiedene Typen von Vesikeln unterscheiden. In dieser Arbeit lehnt sich die Terminologie an die 2012 veröffentlichte Publikation von van der Pol und Böing et al.: „Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles“. Es werden vier, von eukaryotischen Zellen abstammende, verschiedene Vesikeltypen unterschieden: Exosomen, Mikrovesikel, Membranpartikel und apoptotische Vesikel.²⁷ In der Literatur findet man außerdem noch den Begriff „Mikropartikel“. Dieser beschreibt Vesikel, die per Zentrifugation isoliert wurden.²⁸ Eine Übersicht über die verschiedenen Charaktereigenschaften gibt Tabelle 3. Hierbei ist hervorzuheben, dass es je nach Quelle zum Teil erhebliche Unterschiede bei den Angaben gibt.

	Exosomen	Mikrovesikel	Membranpartikel	Apoptotische Vesikel
Durchmesser (nm)	50 – 100	20 – 1000	50 – 80, 600	1000 – 5000
Dichte (g/ml)	1,13 – 1,19	unbekannt	1,032 – 1,068	1,16 – 1,28
Morphologie (TEM)	becherförmig	becherförmig	becherförmig	heterogen
Zellulärer Ursprung	Meisten Zellarten	Meisten Zellarten	Nur Epithelzellen	Alle Zellarten
Herkunft	Plasmamembran der Endosomen	Plasmamembran	Plasmamembran	Plasmamembran des endoplasmatischen Retikulums

Tabelle 3. Übersicht der verschiedenen Typen eukaryotischer zellulärer Vesikel. Tabelle nach van der Pol und Böing et.al.²⁷

Der Durchmesser der extrazellulären Vesikel variiert zwischen 50 nm und 2 μm ²⁸. Ihre weitere Differenzierung beruht mitunter auf ihrem Entstehungsweg (s. Abbildung 7).

Mikrovesikel entstehen durch die direkte Ausknospung und Freisetzung aus der Plasmamembran und haben einen Durchmesser von 20-1000 nm (s. auch Abbildung 8). An diesem Vorgang sind unter anderem das Aktin-Zytoskelett und die Sphingomyelinasen beteiligt.

29, 30

Exosomen, im Folgenden näher erläutert, entstehen durch die intraluminale Einstülpung einer endosomalen Grenzmembran und die nachfolgende Exozytose der Vesikel durch Fusion mit der Plasmamembran (s. auch Abschnitt 1.3.1).²⁹

Apoptotische Körper entstehen während der Apoptose, dem programmierten Zelltod, durch bläschenbildende Absonderungen der Zelle.²⁸ Sie weisen einen Durchmesser von 1-5 μm auf.²⁷

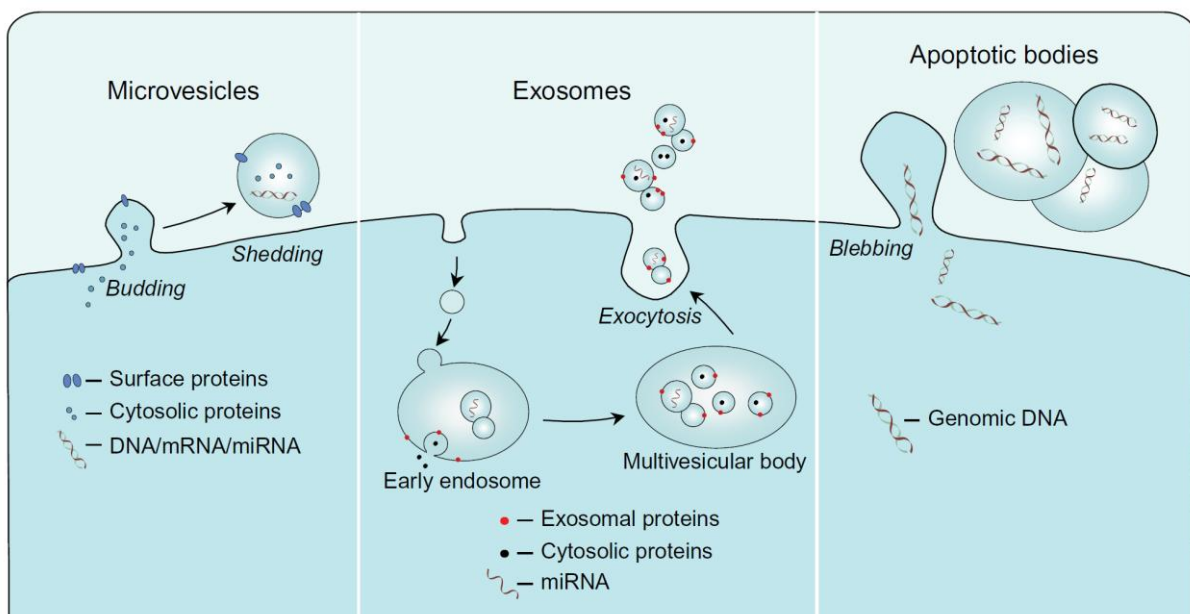


Abbildung 7. Schematische Darstellung der Entstehung von Mikrovesikel, Exosomen und Apoptotischen Körper. Die Abbildung zeigt schematisch die Entstehung von Mikrovesikel (links), Exosomen (mittig) und Apoptotischen Körpern (rechts). Mikrovesikel entstehen durch die direkte Ausknospung einer Plasmamembran. Exosomen werden zunächst durch Einstülpung der endosomalen Grenzmembran gebildet und als Endosomen bezeichnet. Bei der Fusion mit der Plasmamembran und Exozytose dieser Endosomen, werden sie zu Exosomen. Apoptotische Körper sind Absonderungen der Zelle während der Apoptose. Abbildung von Lawson und Vicencio et.al.²⁸

1.3.1 Exosomen

Exosomen sind, je nach Quelle, im Durchmesser 30-100 nm große und 1,13 bis 1,19 g/ml dichte Vesikel.^{27, 29} Sie haben diverse zelluläre Ursprünge und lassen sich u.a. aus Urin, Aszites, Liquor, Vollblut und Plasma per Ultrazentrifugation und anderen Methoden isolieren. Ihre Morphologie lässt sich als becher- bzw. kugelförmig beschreiben.^{27, 31}

Multivesikuläre Körper (MVB) und ihre intraluminale Vesikel (ILV)

Exosomen entstehen aus dem zytoplasmatischen endosomalen System einer Zelle. Durch Invagination der Plasmamembran einer Zelle bilden sich Endosomen. Diese frühen Endosomen können mit anderen endozytischen Vesikeln verschmelzen und werden abgebaut, recycelt oder sezerniert. Endosomen, die für den Verbleib in der Zelle bestimmt sind, können durch Einstülpung ihrer Membran intraluminale Vesikel (ILV) in sich formen und werden dann als multivesikuläre Körper (MVK, *engl. multivesicular bodies (MVB)*) oder späte Endosomen bezeichnet. Diese ILVs sind Vorstufen der späteren Exosomen und beinhalten u.a. Proteine, Nukleinsäuren und Lipide.^{29, 30} Die Membraneinstülpung wird mitunter von der neutralen Shingomyelinase 2 (nSMase2) reguliert (s. Abbildung 8) und durch die Hydrolysierung von Shingomyelin in Ceramid katalysiert.²⁹ Auf diese Weise können MVBs bis zu 50 intraluminale Vesikel produzieren.³²

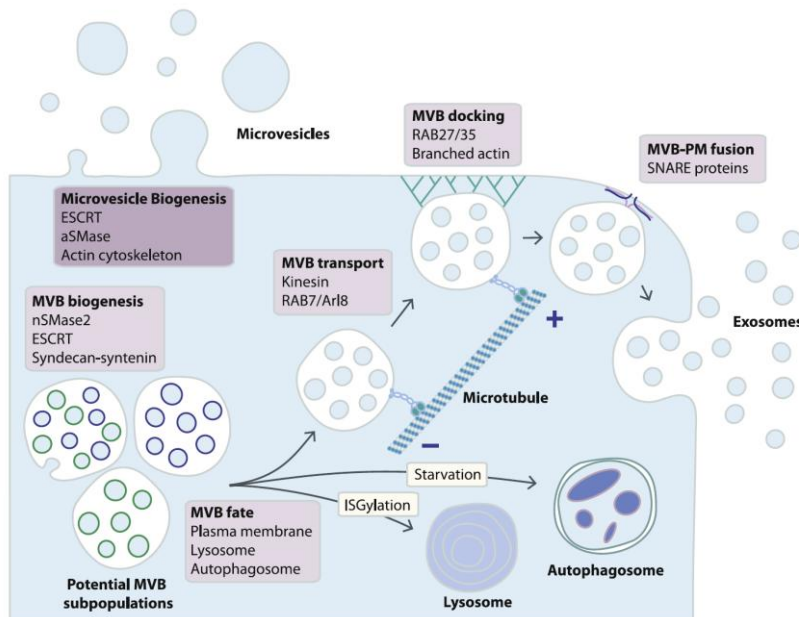


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Mikrovesikel- und Exosomenbiosynthese.

Multivesikuläre Körper (MVB) sind Endosomen mit Ansammlungen von intraluminären Vesikeln, deren Entstehung unter anderem durch die neutrale Shingomyelinase 2 (nSMase2) vermittelt wird. Diese MVBs können entlang der zellulären Mikrotubuli zur Plasmamembran wandern und mit dieser fusionieren. Diese Fusion wird unter anderem durch SNARE Proteine ermöglicht. Die sezernierten Vesikel werden dann als Exosomen bezeichnet. MVBs können aber auch mit Lysosomen oder Autophagosomen verschmelzen und abgebaut werden. Abbildung und Beschreibung von Bebelman und Smit et al.²⁹ Für nähere Erläuterungen siehe Text. Abk.: MVB: multivesicular body; nSMase2: neutral sphingomyelinase 2; ESCRT: endosomal sorting complex required for transport; SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive component attachment protein receptor

Intraluminale Vesikel und ihr Inhalt

Der Syntheseweg der ILVs unterscheidet sich unter anderem durch ihren späteren Inhalt, welcher zum Beispiel durch ESCRT Proteine (endosomal sorting complex required for transport) beeinflusst wird. Es gibt mitunter vier verschiedene Proteinkomplexe, die daran beteiligt sind: der ESCRT-0, I, II, III.³⁰ Eine Variante der ILV-Synthese bzw. Beladung, ist der Ubiquitin-basierte Weg. ESCRT-0 erkennt mit Ubiquitin markierte Proteine und hält diese in der spät endosomalen Membran zurück, wodurch diese in späteren Exosomen vorzufinden sind. ESCRT-I/II führt zu einer initialen Einstülpung der spät endosomalen Membran, woraufhin ESCRT III dessen Annäherung hervorruft. Die endgültige Abspaltung der Knospe von der MVB Membran wird dann durch die ATPase VPS4 ausgeführt.²⁹ Inwiefern diese Einstülpung den ESCRT wirklich benötigt, wird weiterhin diskutiert. Es gibt aber Hinweise, dass einige seiner Proteine, wie vor allem das ALIX, daran beteiligt sind.²⁸ Ein weiteres Beispiel für die Aufnahme von Proteinen in spätere Exosomen ist der Ubiquitin-unabhängige

Syndecan-Synthesin-ALIX Biogeneseweg. Hier spielen Syndecan (ein Heparansulfat Proteoglykan der Membran) und das ALIX (ein ESCRT-III-assoziiertes Protein) eine Rolle. Synthesin, ein kleines zytosolisches Adapterprotein, vermittelt die Adaptierung von Syndecan und ALIX.^{29, 30, 32} Dies kann ferner durch eine Heparanase beeinflusst werden, indem sie die Heparansulfatkette kürzt, was nachfolgend zu einer Cluster-Bildung von Syndecan führt. Das Syndecancluster stimuliert einen vermehrten Syndecan-Synthesin-ALIX Syntheseweg. Heparanase kann außerdem an der Beladung der Exosomen mitwirken, wie es für das Tetraspanin CD63 gezeigt wurde. Der Einbau von CD63 kann aber auch durch die kleine GTPase ADP-Ribolysierungs-Faktor 6 (ARF6) und seinem Effektorprotein Phospholipase D2 (PLD2) beeinflusst werden.²⁹

Die Freisetzung von Exosomen

Die multivesikulären Körper (MVBs), die die intraluminalen Vesikel (ILV) in sich tragen, können mit der Zellmembran fusionieren und diese freisetzen. Sezernierte ILVs werden dann als Exosomen bezeichnet. Statt mit der Plasmamembran, können die MVBs aber auch mit Lysosomen fusionieren und dann abgebaut werden (s. Abbildung 8). Welcher Weg gegangen wird, ist bei Weitem nicht ausreichend verstanden und Gegenstand aktueller Forschung.²⁹ Ein Einflussfaktor scheint die Interferon-stimulierte Glylierung (*engl. ISGylation*) von der ESCRT-I-Komponente TSG101 zu sein, wodurch MVBs vermehrt mit Lysosomen statt der Plasmamembran fusionieren. Man nimmt also an, dass die posttranslationale Veränderung von Cargo-Proteinen das Schicksal der MVBs möglicherweise verändert. Ebenso kann der zelluläre Zustand, wie z.B. Nährstoffmangel, die Fusion mit Autophagosomen induzieren und dementsprechend eine verminderte Exosomen-Sekretion nach sich ziehen.²⁹ Ferner scheinen auch GTPasen der Rab-Familie und die zytosolische Calcium-Konzentration einen Effekt zu haben.²⁷

Kommt es zu einer Fusion der MVBs mit der Plasmamembran, folgt eine Freisetzung der Exosomen durch ein Zusammenspiel von Aktin, Kinesin, Myosin, SNARE-Komplexen und GTPasen u.a. aus der Rab-Familie.^{27, 29, 32} Kinesin fungiert als molekularer Antrieb für die Wanderung der MVBs entlang der Mikrotubuli zur Plasmamembran. Dies kann auch durch Kinesin-Isoformen wie die AR8- oder RAB7-abhängigen Proteinkomplexe reguliert werden. Dabei haben verschiedene Rab-Moleküle vermutlich eine zelltyp-spezifische Funktion und können mit einer spezifischen Exosomenzusammensetzung assoziiert sein.^{29, 30} Nach dem Transport folgt die Andockung der sekretorischen MVBs an die Plasmamembran der Zelle. Die Andockung wird u. a. durch Aktin bewerkstelligt und die nachfolgende Membranfusion wird durch SNARE-Komplexe (SNARE = Soluble N-ethylmaleimide-sensitive component attachment protein receptor) vermittelt. Der Mensch verfügt über eine Vielzahl an SNARE-Proteinen, die durch ihre Lokalisation an verschiedenen intrazellulären Membranstellen die

Fusion von intrazellulären Bestandteilen mit der Plasmamembran induzieren.²⁹ Die Andockung der MVBs führt zu einer Rekrutierung exozytotischer SNARE-Proteine, wie zum Beispiel RAL-1 und Syntaxine. Eine Methode, die Aktivität der SNARE-Proteine zu steuern, ist deren Phosphorylierung. So konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des SNARE-Proteins SNAP23 zu einer vermehrten Exosomensekretion führt.²⁹ Nicht alle Exosomen finden ihren Weg zu nahen oder weit entfernten Zielzellen.³³ Einige bleiben exozytär an ihrer Ursprungszelle haften, wo sie zu einer juxtrakrinen Kommunikation beitragen können.²⁹

Durch den oben beschriebenen Syntheseweg der Exosomen, haben diese eine ihrer Ursprungszelle entsprechende, aber auch veränderte, Membranzusammensetzung. Die exosomale Membran ist reich an Lipiden wie Cholesterin, Shingomyelin, Glykosphingolipide, Ceramid, Ganglioside wie GM3 und Phosphatidylinositol.^{30, 32, 34} Durch den Anteil der verschiedenen Lipiden in der exosomalenen Membran und ihren jeweiligen Syntheseweg, können sich Exosomen von ihrer Ursprungszelle unterscheiden.^{30, 34} Exosomen tragen Proteine an ihrer Oberfläche wie z.B. ALIX, die Heat-Shock Proteine HSP70 und HSP90, sowie die Tetraspanin-Proteine CD9 und CD63. Letztgenanntes ist mutmaßlich an der interzellulären Kommunikation (s.u.) und am Einbau transmembraner Proteine in intraluminalen Vesikel beteiligt.^{27, 28, 32, 33} Diese Marker sind aber bei weitem nicht exklusiv für Exosomen und sie müssen auch nicht identisch zu ihrer Ursprungszelle sein. So kann beispielsweise nicht bei allen Exosomen CD63 nachgewiesen werden. Weitere Oberflächenmarker sind CD146, CD4, CD3 und CD45.²⁸

Zusammenfassend ist die Biosynthese und Freisetzung von Exosomen am ehesten ein dynamischer Prozess, bei dem jede Zelle die Menge einer jeden Exosomen-Subpopulation, als Reaktion auf eine große Menge von externer und interner Stimuli, reguliert.²⁹

1.4 Die microRNA

Vorkommen und Funktion der miRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, aus ca. 21 bis 25 Nukleotiden bestehende, nicht-kodierende RNAs und wurden bereits in nahezu allen menschlichen Flüssigkeiten wie beispielsweise Blut, Tränen, Speichel und Urin nachgewiesen.^{32, 35, 36} Man findet sie in Vesikeln wie Exosomen, Mikrovesikel und Apoptotische Körper oder auch in Low- und High Density Lipoproteinen (LDL, HDL). Vesikel-freie, nur an Ago-Proteinen gebundene, miRNA werden ebenfalls beschrieben.³⁶

MiRNAs haben Einfluss auf die Genexpression von bis zu 60% aller Gene von Säugetieren.³⁶ Dies hat sowohl einen physiologischen als auch pathologischen Einfluss auf die Zellproliferation, -regeneration, -replikation und – differenzierung.^{32, 33, 36, 37} MiRNA-Gene können im gesamten Genom gefunden werden und es wird postuliert, dass die miRNA-kodierenden Sequenzen bis zu 1% des menschlichen Genoms ausmachen.³⁵ Einige von ihnen liegen in nicht (protein)-kodierenden Bereichen, dessen einziges Translationsprodukt eine miRNA ist. Andere sind in einem Intron oder einer untranslatierten Region (UTR) eines proteinkodierenden Gens lokalisiert. Allen gemeinsam ist die Stamm-Schleifen-Vorläufer-RNA Struktur, von der eine oder beide Stränge als Ursprung für die reife miRNA dienen.^{36, 37}

Die Synthese der miRNAs

Die Synthese einer reifen funktionsfähigen miRNA durchläuft mehrere Stufen (vgl. Abbildung 9). Zuerst wird eine gekappte und polyadenylierte primäre miRNA (sog. pri-miRNA) durch die RNA-Polymerase II und III von der Genmatrize transkribiert.^{33, 35–37} Dabei ähneln die hier erforschten Promotoren denen, die auch bei der Transkription von proteinkodierender Gene Anwendung finden.³⁷ Als Nächstes wird die pri-miRNA, entweder bereits während oder an die Transkription anschließend, durch die RNase III Drosha und ihrem assoziierten RNA-Bindungsprotein DGCR8 gespalten. Das Produkt ist eine haarnadelstrukturartige, etwa 60 Nukleotid lange, pre-miRNA. Diese doppelsträngige pre-miRNA wird durch das Enzym Exportin 5 und der GTPase Ran durch die Hydrolyse von GTP zu GDP aus dem Zellkern ins Zytoplasma geschleust.³⁶ Anschließend wird durch die Endonuklease Dicer und seinem assoziierten RNA-bindenden Protein TRBP (transactivation-response RNA-binding protein) oder PACT (protein kinase R-activating protein) die Schleife abgespaltet, woraus eine reife, etwa 22 Nukleotid lange, doppelsträngige miRNA entsteht. Für Drosha und Dicer gibt es verschiedene Spaltungsstellen, deren Anwendung verschiedene „isomiRs“ einer miRNA hervorbringt. Welche der miRNAs produziert wird, kann vom Zelltyp oder auch von verschiedenen Erkrankungen abhängig sein.^{36–38}

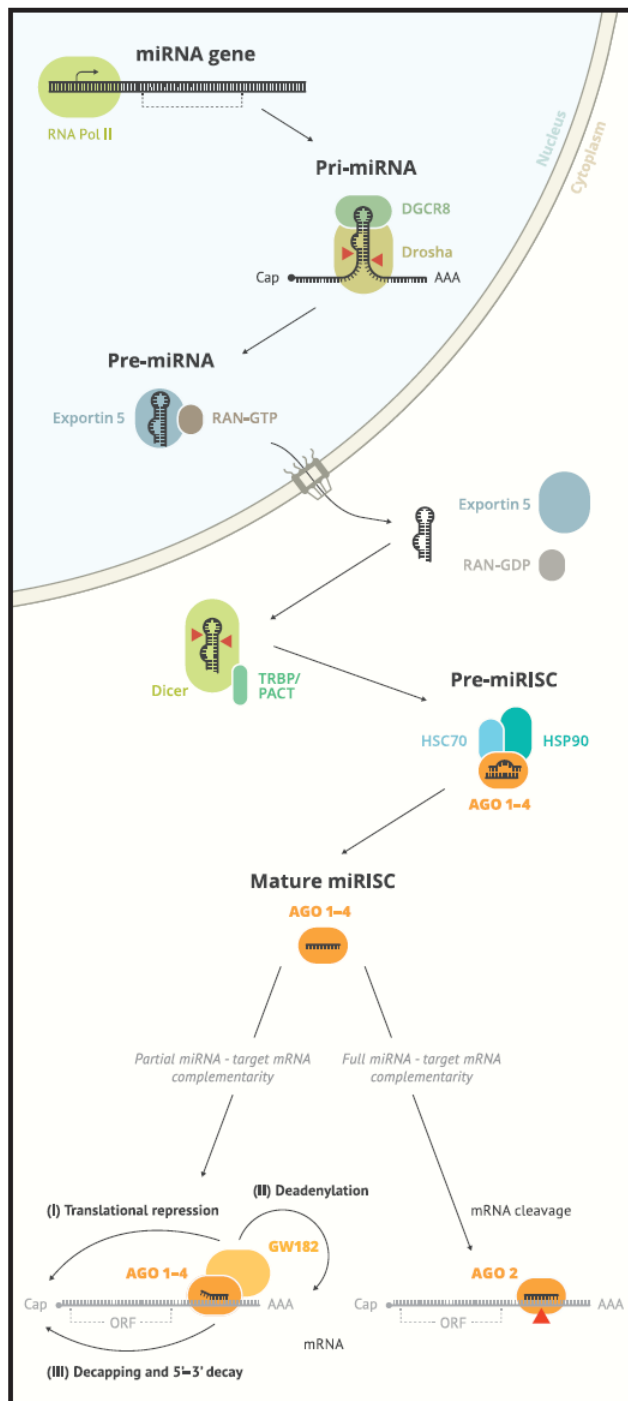


Abbildung 9. Die Synthese der miRNAs. Zunächst transkribiert die RNA-Polymerase II eine 100-1000nt lange pri-miRNA aus der vorhandenen DNA-Genmatrize. Dann wird diese durch die RNase Drosha mit Bindungsprotein DGCR8 gekürzt und diese pre-miRNA durch das Enzym Exportin 5 und der RAN-GTPase aus dem Zellkern transportiert. Im Zytoplasma wird die Schleife der pre-miRNAs durch die Endonuklease Dicer abgespalten. Mit dem RNA-induced silencing complex (RISC) wird dann ein pre-miRISC Komplex gebildet. Hierfür sind Proteine wie die Argonaute 1-4 sowie HSC70 und HSP90 von entscheidender Bedeutung. Die beiden miRNA-Stränge werden gespalten, wobei der Leitstrang mit dem RISC den reifen miRISC-Komplex bildet und der andere abgebaut wird. Die miRISC-Komplexe können je nach Komplementarität zur Ziel mRNA zu dessen Translationshemmung oder beispielsweise Abbau führen.³⁶ Abbildung von Makarova und Shkurnikov et.al.³⁶ Für Einzelheiten siehe Text ab S. 34.

Die miRNA und der RNA-induced silencing complex (RISC)

Einer der beiden miRNA-Stränge wird Teil des RNA-induced silencing complex (RISC), während der andere abgebaut wird. Obwohl der miRNA enthaltene RISC (miRISC) vor allem im Zytosol nachgewiesen wird, gibt es mittlerweile einige Studien, die ihn auch in anderen Kompartimenten der Zelle, wie dem endoplasmatischen Retikulum oder der MVB-Membranen, lokalisieren.³⁶ Das Ergebnis dieser Eingliederung und Trennung der Stränge bringt eine biologisch aktive miRNA und eine inaktive miRNA* (markiert mit einem Stern) hervor. Es wird zunehmend beschrieben, dass auch die miRNAs* in den RISC eingegliedert werden können oder dass der Einbau des einen oder des anderen Stranges vom Zelltyp und/oder dem biologischen Status der Zelle abhängt. Deswegen wird vermehrt die miRNA mit dem 5'-Ende (meist der Leitstrang) des Stammstranges „-5p“ genannt und die mit dem 3'-Ende (meist die miRNA*) „-3p“. ^{33, 36, 37} In solchen Fällen, in denen beide Stränge in das miRISC eingegliedert werden, ist der 5p-Strang der dominante. ³⁵ Welcher von beiden Strängen der aktive Strang ist, hängt auch vom Zelltyp ab. Beispielsweise zeigten Curtale und Renzi et al., dass in humanen Monozyten der miR-511-5p der aktive Strang ist.³⁹

Wichtige Proteine, die den miRISC bilden, sind Argonaute 1-4 (kurz Ago). Wichtig ist vor allem das Ago2, welches als einziges eine Endonukleaseaktivität besitzt. Begleitende Proteine wie HSC70-HSP90 sind ebenfalls beschrieben. Ist die miRNA erstmal in das RISC eingebettet, werden die Stränge auf unterschiedliche Wege voneinander getrennt. Eine Möglichkeit ist die Spaltung des miRNA* vom aktiven miRNA-Strang durch die Endonukleaseaktivität des Ago2. Anschließend wird die miRNA* (oder miRNA-3p) durch den Nukleasekomplex C3PO abgebaut. Dies setzt jedoch eine Komplementarität der Stränge in der zentralen Region voraus, welche oft nicht besteht. In diesen Fällen werden die Stränge durch Strangabwicklung und Helikasen voneinander getrennt. ³⁶⁻³⁸

Ist die miRNA erstmal Teil des RISC-Komplexes, kann sie beispielsweise die Herunterregulierung von Zielgenen durch Interaktion mit mRNAs beeinflussen.³⁶ Ago kann nämlich mit Hilfe eines kurzen Abschnitts der miRNA, auch „Seed“-Region genannt, die zur miRNA komplementären mRNA finden und spalten. Die getrennten mRNA Abschnitte werden dann durch zytoplasmatische Exoribonukleasen abgebaut.³⁵⁻³⁷ In etwa 60% der Fälle gibt es keine komplementäre zentrale Region und es kann somit keine stabile Bindung zwischen miRNA und (meist) 3'-UTR der Ziel-mRNA hergestellt werden, weswegen es alternative Wege geben muss.³⁵

Ein Beispiel ist ein Transport der mRNA durch RISC in P-bodies.³⁶ Diese im Zytoplasma befindenden Komplexe (*engl.* Processing-bodies) bestehen dann unter anderem aus Ago, miRNA, GW182 und der Ziel-mRNA. Ago 1 - 4 rekrutiert eines der drei redundanten Proteine

der GW182 Familie: TNRC6A (auch bekannt als GW182), TNRC6B oder TNRC6C. Diese interagieren mit poly(A)-bindenden Proteinen am poly(A)-Schwanz der mRNA. So wird zum einen die Affinität des RISC zu der mRNA erhöht und zum anderen wahrscheinlich die Translation stimulierende Funktion der poly(A)-bindenden Proteine gestört. Durch Mobilisierung von weiteren Proteinen kann im Anschluss die mRNA durch Hydrolysierung des poly(A)-Schwanzes leichter abgebaut werden.^{33, 36, 37} Es konnte gezeigt werden, dass es auch miRNAs gibt, die nicht an ein RISC oder Ago-Proteinen gebunden sind. Hypothesen zur Vermeidung des miRNAs Abbaus sind unter anderem eine Bindung an anderen Effektorproteinen oder die direkte Bindung an mRNAs.^{33, 36}

Diese Anzahl an beeinflussbaren Abschnitten der Synthese einer einzelnen miRNA macht sehr deutlich, dass die miRNA eine bei weitem nicht endgültig erforschte heterogene Funktion im menschlichen Organismus hat. Die in unserer Studie wichtigen Exosomen und ECVs haben gleichermaßen einen sehr heterogenen Inhalt. So lassen sich beispielsweise Proteine, Lipide und andere Nukleinsäuren wie DNA, tRNA, rRNA, mRNA sowie kurz und lange nicht-kodierende RNA oder miRNA finden.^{29, 30, 36, 40}

1.5 MiRNAs und Exosomen

Zuordnung der miRNA in die Exosomen

Extrazelluläre miRNAs können in Exosomen, Mikrovesikel und Apoptotischen Körper eingeschlossen sein. Des Weiteren können sie auch in Lipoproteinkomplexen wie LDL und HDL gefunden werden.^{32, 41} Etwa 10% der zirkulierenden miRNA sind über Exosomen im Umlauf.³⁵ Mehrere Arbeiten zeigen, dass verschiedene Subpopulationen von Exosomen mit unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften und Inhalten existieren.³⁶ Wie ist das zu erklären und wie wirkt es sich auf das Expressionsmuster der exosomalen miRNAs aus? Bevor man sich mit dieser Frage auseinandersetzt, sollte man sich vor Augen führen, dass das Feld der exosomalen- und miRNA-Forschung noch in den Anfängen steckt und viele Arbeiten zwar Erklärungswege bieten, jedoch keine von ihnen unstrittig ist. In Anbetracht dessen, spiegeln die folgenden Ausführungen einen Auszug des aktuellen Kenntnisstands wider.

Das miRNA-Profil und die Oberflächenmarker von Exosomen können hinweisend auf ihre Ursprungszelle sein, sich von ihr aber auch unterscheiden. Dies kann auf eine Vorselektierung der einzuschließenden miRNA in die Exosomen hindeuten.^{28, 35} Zum Teil kann das miRNA-Profil von extrazellulären miRNAs untereinander ähnlicher sein als im Vergleich zu ihrer jeweiligen Ursprungszelle.³⁶

Das Auffinden von Ago2 und anderen Komponenten des RISC in unmittelbarer Nachbarschaft von multivesikulären Körpern (MVB) deutet auf eine Beteiligung in der exosomalen miRNA Sortierung hin. Allerdings wird Ago2 nicht bei allen ECVs gefunden und weil es ein stabiles Protein ist, das auch außerhalb von Vesikel gefunden wird, bleibt seine Rolle umstritten.^{29, 30, 36} Nachgewiesenes Ago2, GW182 und miRNA auf der zytoplasmatischen Seite von Membranen der MVB können darauf hindeuten, dass RISC und P-bodies dort möglicherweise abgebaut, beladen oder sogar ihre Funktion ausüben können. Eine Hypothese ist, dass der RISC mittels Exosomen die Zelle verlassen und an der Zielzelle weitere Translationen von mRNAs unterdrücken kann.³⁶

RISC-unabhängige Ansätze für die miRNA-Sortierung sind Proteine wie hnRNPA2B1 und hnRNPA1.^{33, 36} Dabei erkennt hnRNPA2B1 (*engl.* heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2B1) die spezifische Sequenz GGAG und UGCA innerhalb einer miRNA und führt so zu einem selektiven Einbau der miRNA in ECVs.⁴² Hinzukommend wurde in einer Studie beobachtet, dass die Änderung der miRNA auf posttranslationaler Ebene ebenfalls die Sortierung beeinflussen kann. Die Anheftung von Adenosin-Nukleotiden an das 3'-Ende der miRNA führt zu einem vermehrten Verbleib in der Zelle, wohingegen eine Anheftung von Uridinen an dieses Ende zu einem vermehrten Vorkommen in Exosomen führt.^{43, 44}

Allgemeiner gesagt, wird vermutet, dass eine Sequenzveränderung einer reifen miRNA den Verbleib in der Zelle oder die Eingliederung in Exosomen bestimmen kann.⁴⁵

Ein weiterer Ansatz die jeweiligen miRNA-Expressionsprofile einer Exosomenpopulation zu erklären, ist die Abhängigkeit des Expressionsniveaus der miRNA an der dazugehörigen mRNA. So kann die Häufigkeit einer mRNAs im Zytoplasma die miRNA-Sortierung in Exosomen beeinflussen, indem bei hoher Expression des Produktes einer mRNA der Einbau der miRNA in Exosomen reduziert wird und vice versa.^{29, 36} Mullokandov et al. haben auch zeigen können, dass die miRNA-Aktivität mit der Menge ihrer Ziel-mRNA in der Zelle größtenteils korreliert.⁴⁶ Es gibt auch Hinweise, dass der Exosomeninhalt durch andere Faktoren wie beispielsweise Hitze, Hypoxie, Nährstoffmangel oder die Zyklusphase in der sich die Zelle befindet, beeinflusst werden kann.^{28, 36}

Interaktion der Exosomen mit ihrer Zielzelle

Erreichen die Exosomen ihre Zielzelle, müssen sie dort mit ihr in Kontakt treten bzw. von ihr aufgenommen werden (vgl. Abbildung 10). Dies sollte nicht zufällig, sondern im Idealfall gezielt gesteuert werden. Die verschiedenen Oberflächenproteine von Exosomen können im unterschiedlichen Ausmaß zur interzellulären Kommunikation beitragen.

Ein entscheidender Weg ist die Aufnahme der Exosomen durch Endozytose der Zielzelle. Dies kann noch weiter unterteilt werden in Clathrin-, Caveolin- oder Lipidraft- vermittelte Endozytose, Makropinozytose und Phagozytose (s. (i) Abbildung 10).^{30, 33, 40} Es gibt Arbeiten die zeigen, dass die Endozytose von Faktoren wie dem Durchmesser der Exosomen, ihrem Ursprung, ihrer Empfängerzelle sowie ihrer Oberflächenmarker beeinflusst wird.^{30, 32} Gerade der Zelltyp spielt eine entscheidende Rolle: so wurde die Clathrin-vermittelte Endozytose und Phagozytose bei Neuronen gefunden, die Caveolin-vermittelte Endozytose bei Epithelzellen, die Phagozytose bzw. Rezeptor-vermittelte Endozytose in dendritischen Zellen und die Lipidraft vermittelte Endozytose in Tumorzellen.³⁰ Der genaue Mechanismus, wie der Exosomen- oder ECV-Inhalt nach der Endozytose aus dem Vesikel gelangt und einen Abbau durch Verschmelzung mit Lysosomen oder eine erneute Sekretion aus der Zelle vermeidet, ist derzeit noch unklar.^{30, 40}

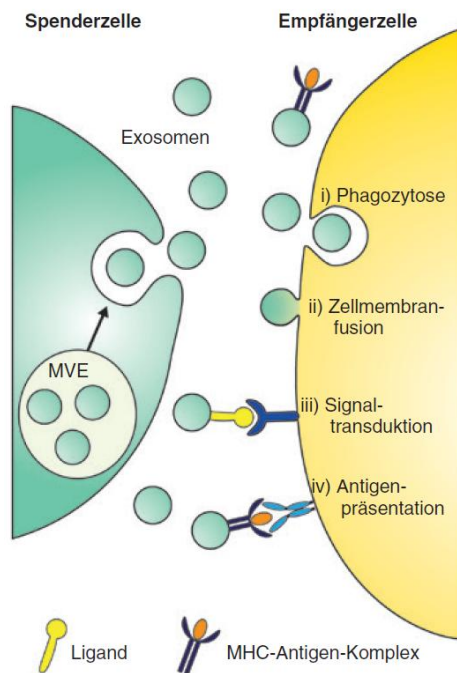


Abbildung 10. Interaktion von Exosomen mit ihrer Empfängerzelle. Exosomen können mit ihrer Empfängerzelle durch Phagozytose, Zellmembranfusion, Signaltransduktion oder Antigenpräsentation in Kontakt treten. Bei der Phagozytose und Zellmembranfusion, werden die Exosomen bzw. ihr Inhalt in die Zielzelle aufgenommen. Bei der Signaltransduktion und Antigenpräsentation wird durch Aktivierung intrazellulärer Signalwege, direkt oder indirekt, Einfluss auf die Zielzelle genommen. Abbildung und Beschreibung von Reiners und Dassler-Plenker et al.⁴⁰ Für Erläuterungen s. Text.

Ein anderer Weg für Exosomen, mit ihrer Zielzelle in Kontakt zu treten, ist die Fusion der exosomalen Membran mit der Plasmamembran (s. (ii) Abbildung 10). Auf diese Weise können nicht nur Rezeptoren der Exosomen in die Plasmamembran aufgenommen werden, sondern der exosomale Inhalt kann ins Zytoplasma gelangen.^{30, 30, 34, 40} Die genaue Funktionsweise ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Arbeit konnte bei Tumorzellen zeigen, dass die Fusion von Exosomen und ihren Zielzellen durch den Umgebungs-pH-Wert und die Temperatur beeinflusst wird.³⁴

Exosomen können auch über die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, sprich über eine Signaltransduktion, einen Effekt ausüben (s. (iii) Abbildung 10).⁴⁰ Ein Beispiel hierfür ist die Interaktion mit Integrin. Dieses existiert ubiquitär auf Zellmembranen und kann als Brücke zur extrazellulären Matrix (EZM) und somit zur Signaltransduktion auf der Zielzelle dienen. Für die Adhäsion wirken Integrin- und Heparansulfat-Proteoglykane zusammen, um das Zytoskelett und die EZM zu verbinden. CD63 kann beispielsweise durch Bindung an Integrin-β2 zu einer interzellulären Kommunikation führen, indem dieses an die TIMP1 (*engl.* tissue inhibitor of metalloproteinase 1) bindet und den PI3K/Akt- Signalweg der Zielzelle

aktiviert. Dies kann zu einer Induktion der Zellproliferation führen.^{28, 33} Ein anderes Beispiel ist das Auffinden von EGFR (Epidermal growth factor receptor) in ECVs, welches bekanntermaßen an einer Signaltransduktion beteiligt sein kann.³⁰

Eine weitere Funktion der Exosomen ist die Antigenpräsentation (s. (iv) Abbildung 10). So können Exosomen sowohl eine Antitumor-Immunreaktion auslösen als auch eine Begünstigung des Tumorwachstums einleiten.^{27, 40} Unterstützt wird diese These durch Auffinden von Proteinen wie MHC I und MHC II in ECVs, die an einer Antigenpräsentation beteiligt sind.^{27, 30}

Wie auch immer Exosomen oder die miRNA mit ihrer Zielzelle kommunizieren, wichtig ist die Auswirkung auf die Genexpression der Zelle. Durch die Analyse der zirkulierenden miRNAs bei gesunden und kranken Studienteilnehmern haben wir uns erhofft, einen Einblick in die Einflussfaktoren der Exosomen und miRNA-Expressionsmuster bei Pneumonie und Sepsis zu erlangen.

1.6 Fragestellung

Ein Biomarker ist ein Indikator für normale oder pathogene biologische Prozesse und kann ein Indiz für pharmakologische Reaktionen des Organismus auf eine therapeutische Intervention sein.⁹ Biomarker können objektive Indikatoren für Gesundheit oder Krankheit sein. Heutzutage werden damit Moleküle, meistens Proteine, beschrieben, die aus verschiedenen Körperflüssigkeiten mittels laborchemischer Untersuchungen bestimmt werden können. Bekannte Beispiele sind das Troponin für kardiovaskuläre Ereignisse, die Aminotransferasen ALT und AST für die Leberfunktion und das PSA für das Prostatakarzinom.³⁵ Im Falle der Pneumonie und vor allem der Sepsis, gibt es derzeit eine Reihe von Laborparameter, u. a. das CRP, das Procalcitonin und Interleukine wie IL-6 und -8, die Klinikern zur Diagnostik verhelfen.^{9, 35, 47} Allen oben genannten Parametern ist gemeinsam, dass sie einzeln betrachtet nicht spezifisch genug für die Pneumonie oder Sepsis sind. Lediglich in Anbetracht weiterer Parameter, Bildgebung und vor allem der klinischen Symptomatik, können Sie hinweisend sein. Durch Zusammenschau der Parameter in verschiedenen Scores, lässt sich eine Prognose für Patienten treffen.¹¹ Einfacher wäre es, wenn man einen minimal-invasiv, leicht zu erhebenden Laborwert zu Beginn der Symptomatik abnehmen und daraus nicht nur die einzelnen Elemente der Pneumonie und Sepsis (Infektion, Körperreaktion und Organdysfunktion) frühzeitig erkennen, sondern gleichzeitig einen klinischen Verlauf prognostizieren könnte. Dieser Parameter sollte gleichzeitig eine hohe Spezifität und Sensitivität aufweisen und von der Forschung in die Klinik übertragbar sein.^{11, 35} Angesichts der reichen Anzahl an Publikationen über Exosomen und miRNAs in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen, liegt es nahe, ihre Bedeutung für die Pneumonie und die Sepsis näher zu untersuchen.³⁵

1.7 Zielsetzung

Es ist vielfach erwähnt, dass die miRNA-Expressionsmuster in zirkulierenden Exosomen, je nach Zustand der Zellen, bei Gesunden und bei verschiedenen Erkrankungen aufgrund einer Vielzahl von Faktoren variieren kann.^{27, 28, 30, 33, 36, 37, 40} Wir haben es uns zum Ziel gemacht, für die Entität der Pneumonie und der durch Atemwegserkrankungen induzierten Sepsis signifikant veränderte zirkulierende miRNAs auszumachen, die möglicherweise als Biomarker für die oben genannten Erkrankungen dienen können. Dabei haben wir versucht, eine leicht reproduzierbare Isolationsmethode für Exosomen im Blutplasma und deren miRNA-Gehalt zu erarbeiten. Ziel war es also, einen Biomarker für die Pneumonie und Sepsis zu finden, der folgende Kriterien aufweist:

1. In der Praxis leicht zu erheben.
2. Sicherstellen einer (frühzeitigen) Diagnose, da er bei Gesunden nicht nachweisbar ist.
3. Zulassen einer prognostischen Beurteilung des Patientenzustandes.

Hierbei sollen patientenbezogene Einflussfaktoren, wie das Alter oder der BMI, die Krankheitsschwere anhand von klinischen Scores und Laborparametern und der klinische Verlauf anhand von möglichen Komplikationen, wie dem akuten Nierenversagen, evaluiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign und Teilnehmerkollektiv

Dies ist eine prospektiv klinisch-experimentelle Studie. Es wurden Patientinnen und Patienten sowie Probandinnen und Probanden* nach genauen Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt und nach erfolgter Einwilligung in die Studie aufgenommen.

Rekrutierung

Einschlusskriterien aller Teilnehmer waren ein Alter über 18 Jahre und die schriftliche Einwilligung nach ausführlicher Aufklärung. Bei Patienten, die aufgrund einer Sedierung nicht selbständig zustimmen konnten, wurde die Einwilligung durch den gesetzlichen Betreuer oder den nächsten Angehörigen eingeholt und durch Unterschrift dokumentiert.

Die gesunden Probanden (Volunteers) wurden über eine öffentliche Ausschreibung und innerhalb des klinischen Personals am Klinikum Großhadern in München zwischen Juli und August 2017 rekrutiert. Die Voraussetzung zum Einschluss war ein Charlson Comorbidity Index (CCI) von 0 Punkten und somit ein Alter von < 50 Jahren sowie ein Ausschluss von Vorerkrankungen aller wichtigen Organsysteme (u.a. chronische Herz- und Lungenerkrankungen, Leber- und Nierenfunktionsstörungen, Diabetes Mellitus und Tumorerkrankungen).⁴⁸

In die Pneumoniekohorte wurden Patienten aufgenommen, die leitliniengerecht mit einer ambulant erworbenen Pneumonie diagnostiziert wurden. Diese wurden über die Notaufnahme des Klinikums Großhadern, Klinik der Universität München, im Zeitraum zwischen April bis Juli 2017 rekrutiert. Einschlusskriterium für diese Kohorte war eine laut der amerikanischen Leitlinie CIPS (Clinical Practice Criteria of the American Thoracic Society of America, Version 2019)⁸ und aktuellen deutschen S3-Leitlinie (S3-Leitlinie: Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention, Update 2016)⁶ diagnostizierte ambulant erworbene Pneumonie (s. S. 12 oder Tabelle 1, S. 16).

Die Patienten mit einer Sepsis wurden von den Intensivstationen des Klinikum Großhadern und der München Klinik Neuperlach, Lehrkrankenhaus der LMU, im Zeitraum zwischen Juli 2015 und Oktober 2017 rekrutiert. Hier wurde als Einschlusskriterium die Hauptdiagnose Sepsis als Folge einer Pneumonie oder einer respiratorischen Infektion gewählt. Die

* In der folgenden Arbeit wird zur besseren Lesbarkeit lediglich die männliche Form verwendet. Es sei darauf hingewiesen, dass stets alle Geschlechter gemeint sind, sofern nicht ausdrücklich anders geschrieben.

Diagnostik erfolgte durch die behandelnden Ärzte, ohne Einflussnahme durch das Studienteam anhand der gültigen Sepsis – 3 Definition (s. S. 17).¹¹

Ausgeschlossen wurden Patienten, die folgende Kriterien aufwiesen: Fehlende Einwilligung, Alter <18 Jahre, Schwangerschaft, vorbestehende chronische Infektionserkrankungen (z.B. Hepatitis B/C, HIV oder Endokarditis), aktive maligne oder Tumorerkrankungen, sowie eine eingeschränkte Lebenserwartung von < 6 Monaten (unabhängig von beispielsweise Sepsis, Pneumonie oder lokaler Infektion). Außerdem wurden Patienten ausgeschlossen, die eine immunsuppressive oder Steroid-Therapie erhielten (z.B. im Rahmen von Autoimmunerkrankungen oder Transplantationen).

Die Daten wurden pseudonymisiert, wobei die Zuordnung nur durch den Studienleiter möglich ist. Dieses Verfahren ist durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität geprüft und ist als ethisch unbedenklich eingestuft worden (Protokoll-Nummer #551-14).

Epidemiologische Datenerfassung

Zur epidemiologischen Datenerfassung wurden die freiwilligen gesunden Probanden zu ihrem Geschlecht, Alter, Gewicht und ihrer Größe befragt und die Angaben pseudonymisiert gespeichert.

Die Pneumoniepatienten wurden ebenfalls zu diesen Angaben befragt. Weitere klinische und laborchemische Parameter sowie diagnostische Ergebnisse, wurden aus dem klinikinternen klinischen Arbeitsplatzsystem von SAP® ermittelt.

Für die sich auf Intensivstationen befindenden Sepsispatienten, wurde das QCare ICU® System (Health Information Management GmbH) zur Dokumentation der Labor- und klinischen Parameter, Medikamentengaben und den diagnostischen Resultaten genutzt. Dieses Dokumentationssystem erlaubt eine genaue Aufzeichnung und wissenschaftliche Auswertung der Patientendaten. Weitere Angaben wie Alter, Größe, Gewicht und Vorerkrankungen konnten aus den elektronischen und nicht-elektronischen Patientenakten entnommen werden.

Blutentnahmen

Die Blutentnahmen erfolgten bei den gesunden Probanden und Pneumoniepatienten über eine einmalige periphere venöse Punktion mittels 21 Gauge Punktionsnadel und langsamer Füllung eines 9 ml Serum-Röhrchens (S-Monovette, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland). Den Sepsispatienten wurde das Serum-Röhrchen über einen liegenden arteriellen Zugang in der Arteria radialis (20 Gauge, 8 cm polyethylen Katheter, Vygon, Aachen, Deutschland) entnommen.

Die Serum-Röhrchen aller Studienteilnehmer wurden nach Entnahme innerhalb von 10 Minuten, bei 3 400 x g für 10 Minuten und Raumtemperatur zentrifugiert. Hierfür verwendeten wir die Tischzentrifuge Multifuge® 3 S-R 230V 50/60 Hz von Heraeus Kendro. Innerhalb weiterer 10 Minuten wurde der Serumüberstand in 1 ml Portionen in Kryoröhrchen aliquotiert und anschließend bei - 80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.2 Molekulargenetische Untersuchung

Die extrazellulären Vesikel wurden aus den Serumüberstand mit dem miRCURY® Exosome Isolation Kit – Serum and Plasma (Qiagen, Venlo, Niederlande) isoliert. Die Exosomenausbeute ist danach durch die Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) (NanoSight®) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) kontrolliert worden. Die Existenz der Exosomen in der Probe wurde durch die Darstellung der Oberflächenproteine mittels Western Blot bewiesen.

Exosomen sind nicht ausschließlich mit miRNAs beladen. Es konnten auch mRNAs, kleine Mengen DNA und Proteine nachgewiesen werden.^{28, 40} Für die Isolierung der für unsere Arbeit relevanten miRNAs wurde der gesamte RNA-Gehalt der isolierten Exosomen mittels miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) extrahiert. Zur Ermittlung und Differenzierung der Größenverteilung und Ausbeute dieser extrahierten gesamten RNA nutzen wir die Kapillarelektrophorese des 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit dem dazugehörigen RNA 6000 Pico Assay Kit (Bestell-Nr. 5067-1513, Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Anschließend wurde im Rahmen unserer Studie für die hier untersuchte Kohorte und eine weitere Bestätigungskohorte die small RNA-Seq Hochdurchsatzsequenzierungsmethode durchgeführt. Hierfür wurde zuerst die miRNA mit dem NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set für Illumina (New England BioLabs) mit Adaptoren ligiert, um sie nachfolgend in eine cDNA-Bibliothek umzuschreiben. Im nächsten Schritt wurden sie mittels PCR amplifiziert und mit Barcodes kodiert. Damit man aus den exosomalen RNAs die gewünschten miRNA erhalten kann, wurden diese durch eine hochauflösende 4% Argarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und die gewünschten 130-150 bp langen miRNA mit MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) extrahiert. Die Konzentration von Ligationsprodukten, die miRNAs entsprechen, wurde auf dem 2100 Bioanalyzer mit dem DNA 1000 Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bestimmt und so eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle durchgeführt. Im Anschluss konnte die miRNA mit der HiSeq2500 von Illumina sequenziert werden.

Die einzelnen Schritte werden im Folgenden nun detailliert dargestellt.

2.2.1 Extraktion der Exosomen

Die zuvor eingefrorenen 1 ml großen Proben wurden zur weiteren Verarbeitung aufgetaut. Anschließend wurden die Exosomen gemäß dem miRCURY® Exosome Serum/Plasma Kit (cat. no. 76603, Qiagen, Venlo, Niederlande)⁴⁹ aus den Serumproben extrahiert. Dies ermöglicht eine parallele Verarbeitung von 10 Proben.

Die einzelnen Schritte sind wie folgt:

1. Die gefrorenen Serumproben werden auf Eis aufgetaut.
2. Das Serum wird aus den Sammelröhrchen in neue vorher beschriftete 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße übertragen.
3. Es werden 10 µL Thrombin der Probe hinzugefügt und 5 mins bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubiert.
4. Anschließend werden die Proben für 5 mins bei 10 000 x g zentrifugiert, um überschüssige Zelldebris zu entfernen.
5. Der Überstand wird in eine 1,5 ml Tubes abpipettiert.
6. Es werden der Probe 400 µL des Präzipitationspuffer A hinzugefügt und anschließend für 5 Sekunden gevortext, sodass ein Homogenisat entsteht.
7. Das Gemisch wird für 60 mins im Kühlschrank bei 2-8°C inkubiert.
8. Anschließend wird die Probe für 30 mins bei 1 500 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert.
9. Der Überstand wird vollständig verworfen.
10. 270 µl Resuspensionspuffer werden in das Röhrchen mit dem Pellet gegeben und mit einer Pipettenspitze mechanisch gelöst. Anschließend wird das Gefäß gevortext, bis dass das Pellet vollständig resuspendiert ist.
11. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Proben im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Das Endvolumen wird im Verlauf zur RNA-Isolation genutzt (s. Abschnitt 2.2.2). Um die Qualität der Exosomen zu kontrollieren, folgten die NTA, TEM und der Western Blot (s.u.). Die isolierten Exosomen können bei 4°C für bis zu 2 Tage oder bei -20°C auch länger gelagert werden. Um eine mögliche Kontamination zu vermeiden, erfolgte die weitere Verarbeitung zeitnah.⁴⁹

2.2.1.1 Qualitätskontrolle

2.2.1.1.1 Nano Tracking Analysis (NTA)

Mit der Nano(particle) Tracking Analysis (NTA) kann man Nanopartikel, darunter auch Exosomen, mit einer Größe zwischen 40 nm und 1000 nm vermessen.⁵⁰ Die zu messenden Vesikel befinden sich in einer flüssigen Suspension und bewegen sich kontinuierlich nach der Brownschen Molekularbewegung.⁵¹ Diese ist abhängig von der Temperatur, Dichte und von dem Durchmesser des Partikels, weshalb die NTA-Software NanoSight NS300 (Version 3.00, Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland) bei Kenntnis der anderen Parameter die Größe und Größenverteilung der Partikel mittels Stoke-Einstein Gleichung berechnen kann.^{31, 51–54}

In dieser Versuchsreihe wurde ein „Malvern NanoSight LM10 Instrument“ (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland) mit einem monochromatischem 405 nm Laser verwendet. Die Exosomen wurden vorher in partikelfreiem PBS 1:10 000 verdünnt. Das PBS wurde durch eine Zentrifugation bei 120 000 x g bei 4 °C für 14 Stunden mit einem k-Faktor von 231.6 hergestellt. Der k-Faktor beschreibt die Effizienz des Rotors der Zentrifuge in der vollständigen Sedimentierung der Partikel: je kleiner der Wert, desto weniger Zeit benötigt die Zentrifuge.⁵⁵ Die Proben wurden manuell in die Maschine eingeführt. Es wurden pro Probe 6 Videos à 45 Sekunden mit einer hochsensitiven sCMOS Kamera und einer Bildfrequenz von 25 Hz aufgenommen. Die Partikel wurden bei einem Kameralevel von 10 mit der NTA-Software (NTA-Software, Version 3.00068) verfolgt und mit dem Finite Track Length Adjustment (FTLA) Algorithmus verrechnet. Für die Analyse wurden nur Aufnahmen mit mindestens 2 000 vollständig aufgenommenen Verläufen eingeschlossen, bei Einstellungen wie der Unschärfe (*blur*) und minimale Verfolgungslänge (*minimal track length*) auf Auto. Die endgültige Partikelkonzentration im Serum wurde, ausgehend von der NTA gemessenen Konzentration, mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor der Probe berechnet, wie durch eine andere Arbeitsgruppe bereits beschrieben.⁵⁶

2.2.1.1.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Das Prinzip der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) beruht auf der Beobachtung eines Elektrons, bei dessen Durchwanderung eines Präparates. Diese Interaktion verändert die Wellenfunktion (Amplitude und Phase) der Elektronen. Aus diesen Daten lässt sich dann ein Bild mit einer Auflösung von bis zu < 1 nm projizieren, woraus man die Größe und Morphologie einzelner Mikrovesikel bestimmen kann.⁵⁷

In unserer Versuchsreihe nutzen wir ein Zeiss EM900 (Carl Zeiss Mikroskop GmbH, Jena, Deutschland) Elektronenmikroskop bei 80 kV, welches mit einer eingebauten „Wideangel-dual-speed“-2K-CCD Kamera (Augenklinik der Universität München) erweitert wurde.

Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet:

1. Fixierung der Exosomen in einer 2% Paraformaldehydlösung und Aufbringen/Absorption auf ein formvar/kohle-beschichtetes 200-Maschen Nickelnetz (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA) für 15 min.
2. Waschen der Netze mit PBS.
3. Fixierung in 2,5 % Glutaraldehyd für 5 Minuten.
4. Waschen mit milliQ® Wasser (Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland).
5. Negativ-Färbung der Gitter für 1 min in 2 % Uranylacetat Lösung (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland)
6. Nochmaliges Waschen der Netze mit milliQ® Wasser und Lufttrocknung über Nacht.

2.2.1.1.3 Western Blot

Der Western Blot, erstmalig als solcher 1981 bezeichnet, wurde 1979 durch Towbin et al. vorgestellt.^{58, 59} Seither gilt er als Standard für die Verarbeitung und Erforschung von Proteinen und ist weltweit eine der am meist genutzten Analysetechniken in wissenschaftlichen Laboratorien.⁶⁰ Dabei beschreibt „Blotting“ die Übertragung von, sich auf einem Gel befindenden, Makromolekülen auf eine immobilisierende Matrice.⁶¹ Korrekterweise müsste hier der Begriff „Protein Blotting“ genutzt werden, wobei in dieser Arbeit, der in der Wissenschaft geläufigere Begriff Western Blot genutzt wird. Verwendung findet es in der Forschung zur Identifizierung, Markierung und (Semi-)Quantifizierung von spezifischen Proteinsequenzen aus Gewebe oder Zellen.⁶⁰

Zunächst wird eine Elution und Aufreihung der Proteine nach ihrem molekularen Gewicht mittels Gelelektrophorese und die Übertragung auf ein immobilisierendes Medium durchgeführt⁶²: Hierfür wurden die Exosomen für 15 Minuten mit eiskaltem Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) Puffer lysiert und drei Mal à 5 Minuten in einem Ultraschall-Wasserbad beschallt, um die Lysierung zu verstärken. Danach folgte eine Zentrifugation bei 13 000 x g für 10 Minuten. Damit verschiedene Messdurchgänge miteinander vergleichbar sind, ist eine Messung der Proteinkonzentration im Überstand nach Isolierung erforderlich. Diese wurde mit der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland) durchgeführt, bei der mittels Photometrie des entstandenen blau-violetten Farbkomplex eine Quantifizierung möglich ist. Für die eigentliche Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteinkomplexe wurde ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) verwendet. Das SDS ist ein Detergens, welches Proteine durch Bindung negativ lädt und stabilisiert, sodass die Auftrennung rein aufgrund ihres molekularen Gewichts geschieht.⁶⁰ Das Polyacrylamidgel enthält Poren die dafür sorgen, dass diese je nach Molekülgröße

unterschiedlich schnell wandern. Auf das vom Hersteller vorgefertigte Gel (NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel (Invitrogen, Waltham, USA) wurde erst eine 0,45 µm Nitrozellulose-Membran (GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, Großbritannien) gelegt und auf diese ein puffergetränkter nasser Filter. Als nächstes wurde das Konstrukt in einer Pufferlösung getränkt. Dabei muss gemäß Herstellerangaben unterschieden werden, ob es sich um eine reduzierende Elektrophorese (z.B. für den Antikörper TSG101) oder nicht-reduzierende Elektrophorese (z.B. für den Antikörper CD63) handelt. Für die reduzierende Version wurden die Proben für 10 Minuten bei 70°C in Laemmli Puffer (Bio-Rad, Hercules, USA) mit β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) inkubiert, welcher für die Denaturierung der Disulfidbrücken der Proteine sorgt. Für die nicht-reduzierende Variante, wie bei CD63, wurden die Proben für 20 Minuten bei Raumtemperatur in nicht-reduzierendem Laemmli Puffer (Bio-Rad, Hercules, USA) getränkt.

Danach folgt die Visualisierung der Proteine durch Markierung mit primären und sekundären Antikörpern, die nur an die gewünschten Sequenzen binden. Daraufhin erfolgt die Darstellung mittels Banden. Damit eine spezifische Bindung der Antikörper an die Zielproteine gewährleistet werden kann, müssen unspezifische Proteinbindungen im zuerst blockiert werden. Dies wird erreicht, indem man die Membranen in PBS-Tween mit 1% fettfreier Trockenmilch für eine Stunde bei Raumtemperatur (siehe Handbuch) inkubiert. Das Protein aus der Trockenmilch besetzt Stellen auf der Membran, die vorher nicht von Proteinen besetzt wurden und verhindert so ungewünschte Antikörperbindungen. Die nachfolgende Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Folgende Antikörper wurden verwendet: von Abcam (Cambridge, Großbritannien) die Antikörper Mouse anti-TSG101 clone: 4A10, ab83, 1:800; Rabbit anti-Syntenin clone: EPR8102, 1:5000 und ab57113 1:250; sowie Mouse anti-CD63 clone: TS63, ab59479 1:500 und Mouse anti-human Serum Albumin clone 1A9: ab37989 1:250. Von OriGene Technologies (OriGene Technologies, Rockville, USA) den Rabbit anti-CD81: TA343598, 1:500 und von Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland) den Goat anti-Calnexin: WA-AF1179a, 1:2500 Antikörper.

Anschließend wurden die Membranen drei Mal à 5 Minuten mit „Blocking Solution“ (PBS-Tween mit 1% fettfreier Trockenmilch) gewaschen, um im Folgenden mit den Meerrettichperoxidase („Horseradish Peroxidase“(HRP))-gekoppelten sekundären Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert zu werden. Hierfür wurden von Abcam (Cambridge, Großbritannien) folgende sekundäre Antikörper bezogen: Goat anti-Mouse: ab97040, 1:10 000; Goat anti-rabbit: ab97080, 1: 10 000 und Rabbit anti-goat: ab97105, 1:10 000.

Nach der Inkubationszeit wurden sie wiederholt drei Mal à 5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Die Peroxidase der sekundären Antikörper katalysiert (nach Zugabe einer Luminolperoxid-Nachweisreagenz) in Gegenwart von Peroxid die Oxidation von Luminol, welches zu einer Lichtemission von niedriger Intensität bei 428nm führt. Hierfür haben wir den

„Clarity™ Western ECL Blotting Substrate Kit“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Zur Aufnahme der emittierten Lichtsignale nutzten wir eine CCD-Kamera (charged couplet device-camera).

2.2.2 Extraktion der miRNA

Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem miRNeasy® Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) aus den vorher isolierten Exosomen (s. S. 47). Folgendes Protokoll wurde angewendet⁶³:

1. Von den aufgetauten Proben werden 200 µl in ein 2 ml Röhrchen transferiert. Dann werden 60 µL Buffer RPL hinzugefügt, für 5 s gevortext und anschließen für 3 mins bei Raumtemperatur (15-25 °C) inkubiert.
2. Hinzufügen von 3,5 µl miRNeasy® Serum/Plasma Spike-In Control ($1,6 \times 10^8$ Kopien/µl) und gründliches vermischen.
3. Danach werden 20 µL Buffer RPP hinzugefügt und > 20 s gevortext. Dies wird dann für 3 mins bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Anschließend wird die Probe für 3 mins bei 12 000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, um das Ausgefällte zu pelletieren.
5. Der klare Überstand (etwa 230 µL) wird in ein neues Gefäß (2 ml Mikroreaktionsgefäß mit Deckel) übertragen.
6. Es wird ein 45 ml Isopropanol hinzugefügt und die Probe gevortext.
7. Die gesamte Probe wird auf ein RNeasy UCP MinElute® Column übertragen. Das Ganze wird für 15 s bei $\geq 8\,000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen.
8. Anschließend werden 700 µL Buffer RWT auf die RNeasy UCP MinElute® Spin Column hinzugefügt und die Probe für 15 s bei $\geq 8\,000 \times g$ zentrifugiert.
9. Danach werden 500 µl Buffer RPE auf die RNeasy UCP MinElute® Spin Column pipettiert. Das Ganze wird wieder für 15 s bei $\geq 8\,000 \times g$ zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.
10. Es werden 500 µl 80% Ethanol auf die RNeasy UCP MinElute® Spin Column hinzugefügt und bei 2 min $\geq 8\,000 \times g$ zentrifugiert, um die Spin Column Membran zu waschen. Der Durchfluss wird verworfen. Anschließend wird die RNeasy UCP MinElute® Spin Column vorsichtig von dem Gefäß getrennt, damit die Column nicht den Durchfluss berührt.
11. Die RNeasy UCP MinElute® Spin Column wird in ein neues 2 ml Gefäß platziert. Bei offenem Deckel wird es für 5 mins bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, damit die Membran trocknet.

12. Danach wird die RNeasy UCP MinElute® Spin Column in ein neues 1,5 ml Gefäß platziert. Es werden 20 µL RNase-freies Wasser hinzugefügt und für 1 min inkubiert. Danach bei geschlossenem Deckel für 1 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert.

Das Ergebnis sind isolierte RNAs mit einer Länge von < 1000 nt/bp. Die Sammelröhrchen wurden, sofern sie nicht direkt weiterverarbeitet worden sind, bei -20 °C gelagert. Für eine längere Aufbewahrung sollten sie allerdings bei mind. -70 °C eingefroren werden.⁶³

Die Größenverteilung und totale RNA-Ausbeute wurde mittels Kapillarelektrophorese überprüft. Hierzu wurde der RNA 6000 Pico Kit des 2100 Bioanalyzers (Bestell-Nr. 5067-1513, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verwendet.

2.2.3 Hochdurchsatzsequenzierung

Die Next-Generation Sequencing (NGS) und die bioinformatische Auswertung fand in dieser Arbeit in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Tierphysiologie und Immunologie der Technischen Universität München in Freising-Weihenstephan statt (Ansprechpartner der Arbeitsgruppe ist Prof. Dr. Michael W. Pfaffl).

Unsere genaue Vorgehensweise war wie folgt: Die Elutionsschritte wurden in dieser Arbeit zwei Mal durchgeführt, um die RNA-Ausbeute zu erhöhen. Vor der weiteren Verarbeitung der Proben, wurden diese für die small RNA-Seq auf 8 µl (Savant SpeedVac SC100, Savant Instruments Inc., Bloomberg, USA) und für die RT-qPCR Kontrolle auf 9 µl (Concentrator plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vakuum-induziert zentrifugalverdampft.

Für die RNAs der Gruppen (Volunteers, Pneumonie und Sepsis) wurden cDNA (komplementäre DNA)-Bibliotheken hergestellt. Hierfür wurden 6 µl der exosomalen RNA verwendet und folgendermaßen verarbeitet: Zuerst erfolgte eine Adapter-Ligation am 3'-Ende, dann eine reverse Transkriptase Primer-Hybridisation und danach eine 5'-Adapterligation. Es erfolgte die cDNA-Synthese aus dem Matrizenstrang und nachfolgend die Amplifizierung mit einer PCR. Der letzte Schritt erfolgte mit dem NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set für Illumina (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA). Damit eine Bildung von Primer-Dimeren reduziert werden kann und um einen möglichen geringen Input an RNA-Menge zu kompensieren, wurden alle Adapter und Primer im Verhältnis von 1:2 in nukleasefreiem Wasser verdünnt. Die hiernach folgende 4%-Agarose-Gelelektrophorese (MinElute Gel Extraktion) diente der Aufreihung der gesamten cDNA, woraufhin im Anschluss nur die kleinen mit 130-150 Basenpaaren herausgeschnitten und zur weiteren Analyse genutzt wurden. Zur Qualitätskontrolle dieser Ausbeute wurde das DNA 1000 Kit des Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. 6 ng jeder cDNA Bibliothek, sowie ganze Bibliotheken für Proben mit geringer Konzentration, wurden für die Sequenzierung ausgewählt. Die cDNA-Bibliotheken wurden mittel Monarch® DNA-Gel Extraction Kit (New England Biolabs

Inc., Ipswich, USA) gereinigt. Es erfolgte eine weitere Qualitätskontrolle mittels DNA High Sensitivity Kit des 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Die anschließende Sequenzierung wurde per single-end Methode in 50 Zyklen auf der HiSeq2500 (Illumina Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

Zur Identifizierung von signifikanten miRNA wurde zuerst die Adaptersequenz mittels Btrim⁶⁴ entfernt und die Qualität der NGS-Reads mittels FastQC (Version 0.11.5)⁶⁵ überprüft. Es überprüft die Sequenzierungsqualität, den GC-Gehalt, das Vorhandensein von Adaptoren, *k*-mers und Duplikaten.⁶⁶

Alle reads ohne Adapter und einer Länge < 16 Nukleotiden wurden verworfen.⁶⁷ Anschließend wurden die reads zum einen mit rRNA und tRNA-Sequenzen und zum anderen mit small nucleolar (snoRNA) und small nuclear RNA (snRNA) mit RNAcentral⁶⁸ verglichen. Dies dient dazu, falsch-positive Ergebnisse bei der Auswertung der miRNAs zu minimieren und als Ergebnis sicher identifizierte miRNAs zu bekommen. Zum Schluss wurden sie noch mit der miRNA-Datenbank miRBase (Version 22)⁶⁹ verglichen.

Die Kartierung (sog. mapping) wurde mit Bowtie⁷⁰ und einem „best alignment“ Algorithmus ausgeführt. Für die weitere Analyse wurden nur Proben mit einem Minimum an 1 Millionen Reads und einem Anteil an 15% miRNAs an der gesamten Bibliothek eingeschlossen. Die miRNAs die diese Kriterien erfüllten wurden mit der humanen Referenz-miRNome Bibliothek verglichen und signifikant veränderte miRNA vermerkt. Die folgende statistische Auswertung wurde mit dem DESeq2 (Version 1.22.1)⁷¹ für R (Version 3.5.1) durchgeführt (s. Abschnitt 2.3.).

2.3 Statistische Analyse

Zum besseren Verständnis der Ergebnisse, zuerst eine kurze Beschreibung der Arbeitsschritte. Zunächst wurden alle zuvor isolierten RNAs sequenziert (siehe S. 52). Im Anschluss wurden diese nach ihrer Größe den verschiedenen nicht-kodierenden RNA-Klassen zugeordnet und sortiert (u.a tRNA, mRNA und miRNA). Die verschiedenen, für unsere Arbeit relevanten, miRNAs wurden nach ihrer Häufigkeit aufgelistet.

Diese *raw read counts* wurden im nächsten Schritt mit dem Bioconductor Package DESeq2 (Version 1.22.1) mittels median-of-ratio Methode normalisiert. Für jede einzelne miRNA konnte dann errechnet werden, ob sich diese zwischen den vergleichenden Gruppen signifikant verändert hat. Weitere Analysen wurden mit dem R package (Version 3.5.1) durchgeführt.

Über die Analyse der differentiellen Genexpression (DGE) des DESeq2 lassen sich drei wichtige Parameter erschließen⁷¹:

1. baseMean: beschreibt die normalisierte mittlere Expressionsstärke der miRNA
→ In unserer Arbeit wurden alle miRNAs mit einem baseMean ≥ 50 read counts betrachtet
2. log₂ fold change: beschreibt die Größe des Expressionsunterschieds zur Basis 2 zwischen den beiden Gruppen
→ In unserer Arbeit wurde ein log₂ fold change (log₂FC) von unter -1 oder über +1 als signifikant bestimmt. Dabei beschreibt ein negativer log₂FC eine im Vergleich reduzierte Expression und ein positiver log₂FC eine vermehrte Expression der miRNA.
3. p-adj: beschreibt den FDR (false discovery rate) – korrigierten p-Wert nach der Benjamin-Hochberg-Methode. Diese zieht in Betracht, mit wie vielen falsch-positiven Ergebnissen man mit diesem p-Wert zu rechnen hätte (zur genaueren Beschreibung siehe entsprechende Fachliteratur).
→ In unserer Arbeit wurde eine FDR von 5% akzeptiert. Das heißt, alle miRNA die einen *p*adj von $<0,05$ hatten, konnten als signifikant angesehen werden.

DESeq2 ermöglicht eine quantitative Analyse der Ergebnisse. In dieser Studie wurden miRNAs, die nur in einer Probe pro Gruppe erfasst wurden, aus der Analyse ausgeschlossen, bevor die signifikante miRNAs anhand des log₂FC bestimmt worden sind. Für jedes Gen bzw. miRNA wird ein generalisiertes lineares Modell angepasst (GLM): u.a. mit Mittelwerten, Dispersion- und Normalisierungsfaktoren. DESeq2 schätzt die Breite der vorherigen Verteilung aus den gemessenen Daten ab und kann darauf basierend automatisch den Schwund-Betrag (sog. *shrinkage*) steuern. Hier ist jedoch Vorsicht geboten, da dies zwar eine genaue Schätzung des zu erwartenden Ausbreitungswertes für miRNAs einer bestimmten Expressionsstärke erbringt, es aber keine genauen Abweichungen einzelner miRNAs vom allgemeinen Trend darstellt. Hierbei wird die empirische Bayes Methode angewendet. Zur Folge hat dies, dass mit Zunahme der Datengröße, die Shrinkage geringer wird, bis diese irgendwann vernachlässigbar klein ist. Durch die logarithmische fold change (LFC) kann man die untersuchten miRNAs ordnen, beispielsweise ob sie im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch- oder runterreguliert wurden. Zur Testung der Signifikanz bzw. Errechnung des p-Wertes benutzt DESeq2 den Wald-Test: Der Quotient aus dem LFC und dem Standardfehler. Damit die getesteten miRNAs als signifikant eingestuft werden können, muss der geschätzte LFC den vorher bestimmten Schwellenwert um einen festgelegten Betrag überschreiten. Die miRNAs die als signifikant eingestuft werden, sind abhängig von der Gesamtzahl der gemessenen miRNAs, bzw. der Größe des Datensatzes. Damit hängt der Schwellenwert von den vorhandenen Daten ab und DESeq2 nutzt einen Schwellenwert, der möglichst viele

signifikante miRNAs hervorbringt. Es errechnet für jedes Gen bzw. miRNA die Wahrscheinlichkeit aus, dass die Nullhypothese (in unserem Fall besagt diese, dass eine Infektion in Form einer Pneumonie oder Sepsis keinen Effekt auf die miRNAs haben) zutrifft.⁷¹ So beschreibt der p-Wert von $\leq 0,05$, dass die Nullhypothese zu $<5\%$ zutrifft und somit verworfen werden sollte.

Statistische Auswertung

Die entsprechenden Datensätze wurden zuerst auf eine Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov- sowie Shapiro-Wilk-Test überprüft, bei denen ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ aussagt, dass die Werte nicht normalverteilt sind. In so einem Fall werden die Ergebnisse als Median mit Interquartilbereich (*engl.* interquartile range, IQR) angegeben. Sollten die Werte normalverteilt sein, werden sie als Mittelwert mit Standardabweichung (*engl.* standard deviation, SD) angegeben. Statistische Unterschiede wurden bei normalverteilten Werten mittels unabhängigen student's t-Test berechnet, nicht normalverteilte (nicht-parametrisch) mittels Mann-Whitney-U-Test. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde die ANOVA mit Dunnett (bei nicht normalverteilten Datensätzen) bzw. Tukey (bei normalverteilten Datensätzen) post hoc Test gerechnet. Zur Untersuchung der Korrelation von Variablen wurden für normalverteilte Datensätze die Pearson-Methode angewandt und für nicht normalverteilte Datensätze, wie die Veränderung von miRNAs zwischen den Gruppen, die Spearman-Methode. Zum Vergleich von kategorischen Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test und der Fisher-exakt Test angewendet. Alle Tests wurden zwei-seitig (two-tailed) gerechnet und mit einem $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Bei der Analyse der miRNA-Expressionsprofile und der Zusammenhang mit klinischen Variablen und Parametern wurde wie folgt vorgegangen: In einem ersten Schritt wurden alle signifikant regulierten miRNAs zwischen Pneumonie und Volunteers bzw. Sepsis und Pneumonie mit klinischen Variablen korreliert. Hierfür wurde die Spearmans Rangkorrelation angewendet. Signifikante positive bzw. negative Korrelationen wurden mit einem $p \leq 0,05$ zur weiteren Analyse genutzt. In einem zweiten Schritt wurden die Korrelationen auf ihren Zusammenhang hin überprüft. Hierfür wurden bei metrisch skalierten Variablen eine multiple logistische Regression angewendet, bei binären Variablen die binäre logistische Regression und bei ordinal skalierten Parametern die ordinale Regression. Auch hier wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ verwendet. Konnte ein Zusammenhang nachgewiesen werden, wurden in einem letzten Schritt die miRNAs auf ihre Fähigkeit eines Biomarkers hin überprüft. Hierfür wurde die ROC-Analyse-methode und AUC verwendet. Das beste Ergebnis für die Sensitivität und Spezifität wurde nach dem Youden Index (Sensitivität + Spezifität – 1) gewählt.⁷² Alle Auswertungen wurden mit SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26; IBM Corp., Armonk, N.Y., USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Studienkollektiv

In dieser Studie haben wir ein Gesamtkollektiv von 67 Studienteilnehmer eingeschlossen. Zwölf Patienten mit einer ambulant erworbenen Pneumonie („Pneumonie“), 28 Patienten auf der Intensivstation mit einer Sepsis (davon 23 Patienten im septischen Schock, zusammengefasst als „Sepsis“) sowie 27 freiwillige gesunde Probanden („Volunteers“). Eine ausführliche Beschreibung der Studienteilnehmer kann der Tabelle 4 entnommen werden.

Ergebnisse

Parameter	Pneumonie (n=12)	Sepsis (n=28)	Volunteers (n=27)	Chi2-Test/Exakter Test nach Fischer	p-Wert Student's t-Test	p-Wert Mann-Whitney-U-Test
Geschlecht (m/w)	8 (66,7%) / 4 (33,3%)	17 (60,7%) / 11 (39,3%)	16 (59,3%) / 11 (40,7%)	P vs. S: 1,00 P vs. V: 0,734 S vs. V: 1,00	-	-
Alter (Jahre)*	73,00 (SD=12,78) 72,00 (IQR=64,25 - 85,75)	65,11 (SD=13,38) 65,5 (IQR=58,75 – 75,00)	48,0 (IQR=34,0-53,0)	-	-	P vs. S: 0,117 P vs. V: <0,001 S vs. V: <0,001
Größe (cm)	168,70 (SD=7,65)	172,31 (SD=9,02)	176,22 (SD=9,17)	-	P vs. S: 0,136 P vs. V: 0,013 S vs. V: 0,062	-
Gewicht (kg)	79,18 (SD=13,14)	77,07 (SD=20,62)	78,35 (SD=12,8)	-	P vs. S: 0,378 P vs. V: 0,429 S vs. V: 0,395	-
Body mass index (kg/m²)	27,43 (SD=4,40)	25,68 (SD=6,06)	25,16 (SD=2,83)	-	P vs. S: 0,198 P vs. V: 0,035 S vs. V: 0,348	-
Dauer des ITS-Aufenthalt (Tage)	-	13,0 (IQR=9,0-34,0)	-	-	-	-
Dauer Klinikaufenthalt (Tage)	-	30,0 (IQR=20,0-44,0)	-	-	-	-
Dauer der invasiven Beatmung (Tage)	-	15,11 (SD=12,7)	-	-	-	-
Schwere der Sepsis (Sepsis / septischer Schock nach Sepsis-3 Definition)	-	5 (17,9%) / 23 (82,1%)	-	-	-	-
Verstorben (Ja / Nein)	1 (8,3%) / 11 (91,7%)	6 (21,4%) / 22 (78,6%)	0 (0%) / 27 (100%)	P vs. S: 0,652	-	-
Erreger (n)	gram-negativ: 1 gram-positiv: 0 kombiniert: 0 andere Bakterien: 0 Viren: 0 Pilze: 0 Kein Erregernachweis: 11	gram-negativ: 11 gram-positiv: 6 kombiniert: 1 andere Bakterien: 2 Viren: 0 Pilze: 0 Kein Erregernachweis: 8	-	-	-	-

Tabelle 4. Fortsetzung nächste Seite

Ergebnisse

Parameter	Pneumonie (n=12)	Sepsis (n=28)	Volunteers (n=27)	Chi2-Test/Exakter Test nach Fischer	p-Wert Student's t-Test	p-Wert Mann-Whitney-U-Test
Acute kidney injury (Ja / Nein)^{25, 73}	-	15 (53,6%) / 13 (46,4%)	-	-	-	-
RIFLE Score an Tag 0^{25, 73}	-	Nein: 15 (53,6%) Risk: 3 (10,7%) Injury: 4 (14,3%) Failure: 6 (21,4%)	-	-	-	-
AKIN Score an Tag 0^{25, 73}	-	Nein: 15 (53,6%) Stadium 1: 3 (10,7%) Stadium 2: 4 (14,3%) Stadium 3: 6 (21,4%)	-	-	-	-
Nierenersatzverfahren (Ja/Nein)	-	10 (35,7%) / 18 (64,3%)	-	-	-	-
Max. Laktat Tag 0 (mmol/l)	-	3,26 (SD=2,14)	-	-	-	-
Leukozyten Tag 0 (G/l)	9,85 (SD=4,76) 8,51 (IQR= 6,24-12,65)	15,36 (SD=7,93) 14,60 (IQR= 8,20-18,57)	-	-	0,032	-
Thrombozyten Tag 0 (x10³/µl)	222,5 (SD= 76,55) 221 (IQR=187,25-245,5)	246,64 (SD= 154,51) 221,5 (IQR=139,25-305,5)	-	-	0,514	-
Procalcitonin Tag 0 (ng/ml)	0,18 (IQR=0,13-0,68)	4,7 (IQR=1,8-9,8)	-	-	-	<0,001
C-reaktives Protein Tag 0 (mg/dl)	11,25 (SD=10,74) 8,55 (IQR=2,05-20,67)	23,60 (SD=10,75) 22 (IQR=15,52-31,5)	-	-	0,002	-
Interleukin-6 Tag 0 (pg/ml)	26,0 (IQR=13,0-64,0)	289,0 (IQR=102,8-2168,5)	-	-	-	0,004
Kreatinin Tag 0 (md/dl)	1,28 (SD=1,15)	1,5 (SD=0,76)	-	-	0,380	-
Harnstoff Tag 0 (mg/dl)	48,0 (IQR=26,0-111,0)	52,5 (IQR=36,0-82,5)	-	-	-	0,571

Tabelle 4. Fortsetzung nächste Seite

Parameter	Pneumonie (n=12)	Sepsis (n=28)	Volunteers (n=27)	Chi2-Test/Exakter Test nach Fischer	p-Wert Student's t-Test	p-Wert Mann-Whitney-U-Test
CURB 65 Score Tag 0	1,0 (IQR=1,0-2,0)	-	-	-	-	-
SAPS II Score Tag 0 ²¹	-	45,54 (SD=19,5) 47,5 (IQR= 24,0-61,5)	-	-	-	-
APACHE II Score Tag 0 ²⁰	-	23,85 (SD=10,78) 23,0 (IQR= 15,0 – 31,0)	-	-	-	-
SOFA Score¹⁶ max. während Studie	-	11,63 (SD=3,27) 12,0 (IQR = 10,0-14,0)	-	-	-	-
SOFA Score¹⁶ Tag 0	-	11,5 (IQR=9,0-13,0)	-	-	-	-
MODS Tag 0 ²²	-	8,15 (SD=3,71) 8,0 (5,0-11,0)	-	-	-	-
Maximale Dosis Noradrenalin (µg/kg/min)	-	1,3 (0,75 – 3,05)	-	-	-	-
Behandlung mit Hydrokortison (Ja/Nein)	-	27 (96,4%) / 1 (3,6%)	-	-	-	-
Dauer der Antibiotikatherapie (Tage)	14,0 (11,0-24,5)	19,16 (SD=10,32)	-	-	-	0,899

Tabelle 4. Patientendaten der Studienkohorten. Werte werden bei normalverteilten Variablen als Mittelwert und Standardabweichung (SD) und bei nicht-normalverteilten Variablen als Median und Interquartilbereich IQR (Q25-Q75) bzw. als Häufigkeit (Prozent) angegeben. Die Normalverteilung wurde zuvor durch den Kolmogorov-Smirnov- sowie Shapiro-Wilk-Test überprüft (Ergebnisse nicht aufgeführt). *Die Altersverteilung der Pneumonie und Sepsisgruppe ist normalverteilt, zur besseren Vergleichbarkeit mit der Volunteergruppe sind hier auch die Mediane mit dem Interquartilbereich angegeben. Für die Entzündungswerte wurde auch, wo möglich, die Mittelwerte mit SD und Mediane mit IQR angegeben. Dies gilt auch für die Scores, bei denen der SOFA-Score an Tag 0 nicht normalverteilt ist. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden auch hier bei allen Werten auch die Mediane mit IQR angegeben. Abk.: P: Pneumoniepatienten, S: Sepsispatienten, V: Volunteers

3.1.1 Statistik der demografischen Daten

Hinsichtlich der demografischen Daten wie Alter, Gewicht, Körpergröße und dem Body-Mass-Index (BMI), unterscheiden sich vor allem die Pneumonie- und die Volunteer-Gruppe voneinander. Diese haben signifikante Unterschiede bezüglich des Alters ($p < 0,001$), der Größe ($p = 0,013$) und des Body-Mass-Index ($p = 0,035$). Zusätzlich gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen der Sepsis- und der Volunteer-Gruppe hinsichtlich des durchschnittlichen Alters ($p < 0,001$). Die Altersverteilung der verschiedenen Gruppen unterscheiden sich. Während die Pneumonie- und Sepsisgruppe eine Normalverteilung aufweisen, kann diese für die Volunteergruppe nicht nachgewiesen werden. Der Vergleich der Gruppen ist deswegen auf Basis der Mediane aller Gruppen berechnet bzw. mit Boxplot schematisch dargestellt worden (s. Tabelle 4 und Abbildung 11).

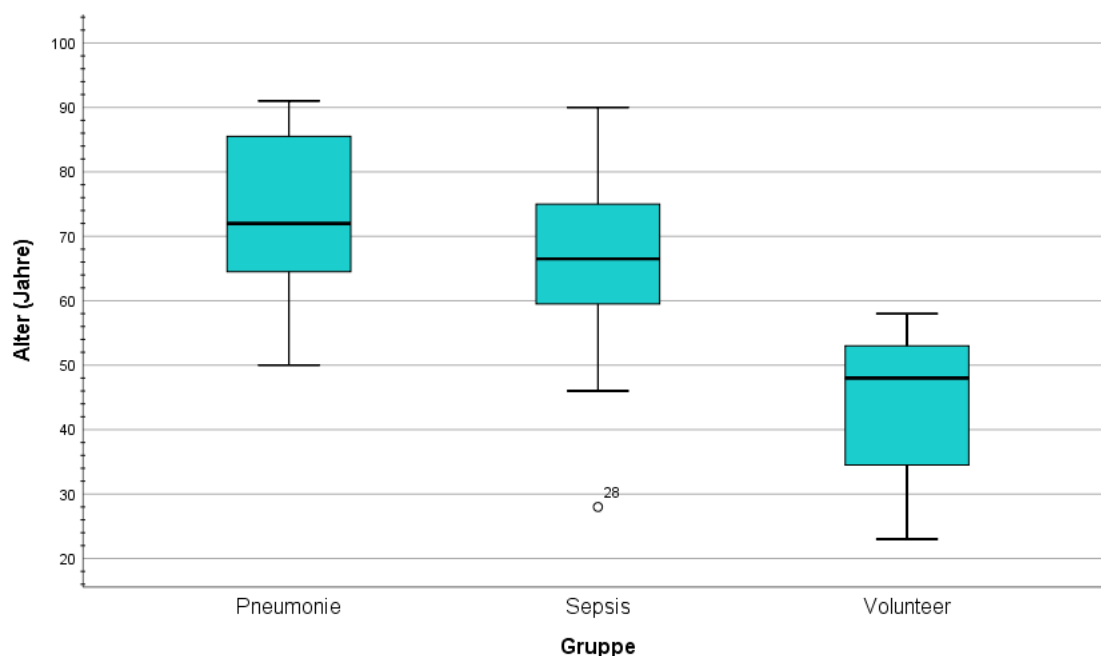


Abbildung 11. Altersverteilung des Studienkollektivs. Der Boxplot ist folgendermaßen zu interpretieren: der Median (50. Perzentile) ist als schwarzer Strich im Boxplot aufgeführt. Die Box bildet sich aus dem oberen Rand (75. Perzentile) und unteren Rand (25. Perzentile). Der Rand rechts und links bildet den Interquartilbereich (IQR) ab (25. Perzentil - 75. Perzentil). Werte, die sich im obersten 25. Perzentil befinden, werden durch einen senkrechten Strich mit Whisker gezeigt. Ausreißer werden mittels Kreise einzeln aufgeführt und der Wert wird angegeben. Pneumonie (Alter in Jahren): Median=72,00 (64,25 -85,75) vs. Mittelwert=73 (Standardabweichung:12,78), Sepsis (Alter in Jahren): Median=65,5 (58,75 – 75,00) vs. Mittelwert= 65,11 (Standardabweichung 13,38), Volunteer (Alter in Jahren): Median=48,0 (34,0-53,0).

Der BMI (Body-Mass-Index) der drei Vergleichsgruppen unterscheidet sich signifikant zwischen der Pneumonie- und Volunteergruppe ($p = 0,035$) (s. Tabelle 4). Die Pneumoniegruppe weist den höchsten BMI mit $27,4 \text{ kg/m}^2$ ($SD = 4,40$), gefolgt von der Sepsis- ($25,7 \text{ kg/m}^2$ ($SD = 6,06$) und der Volunteergruppe ($25,2 \text{ kg/m}^2$ ($SD = 2,83$) auf.

Zur Beurteilung der Komorbiditäten der Studiengruppe Pneumonie und Sepsis (s. Abbildung 12) wurden sie bezüglich der vier epidemiologisch relevantesten Vorerkrankungen evaluiert: Adipositas ($BMI \geq 30,0 \text{ kg/m}^2$), Diabetes Mellitus (unabhängig vom Typ), chronische Niereninsuffizienz (entnommen aus der Patientenakte) und Herzinsuffizienz (ab NYHA-I). Zur Interpretation der Werte und ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen gibt, wurde mit dem exaktem Fisher-Test und dem zweiseitigen p-Wert gerechnet. Hierbei zeigt ein p-Wert $> 0,05$ an, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich eines Merkmals gibt. Bezüglich den Komorbiditäten Adipositas ($p = 0,489$), Diabetes Mellitus ($p > 0,05$) und der chronischen Niereninsuffizienz ($p = 0,211$) konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Lediglich bezüglich der Herzinsuffizienz ($p = 0,033$) zeigten die Pneumonie- und Sepsisgruppe einen signifikanten Unterschied.

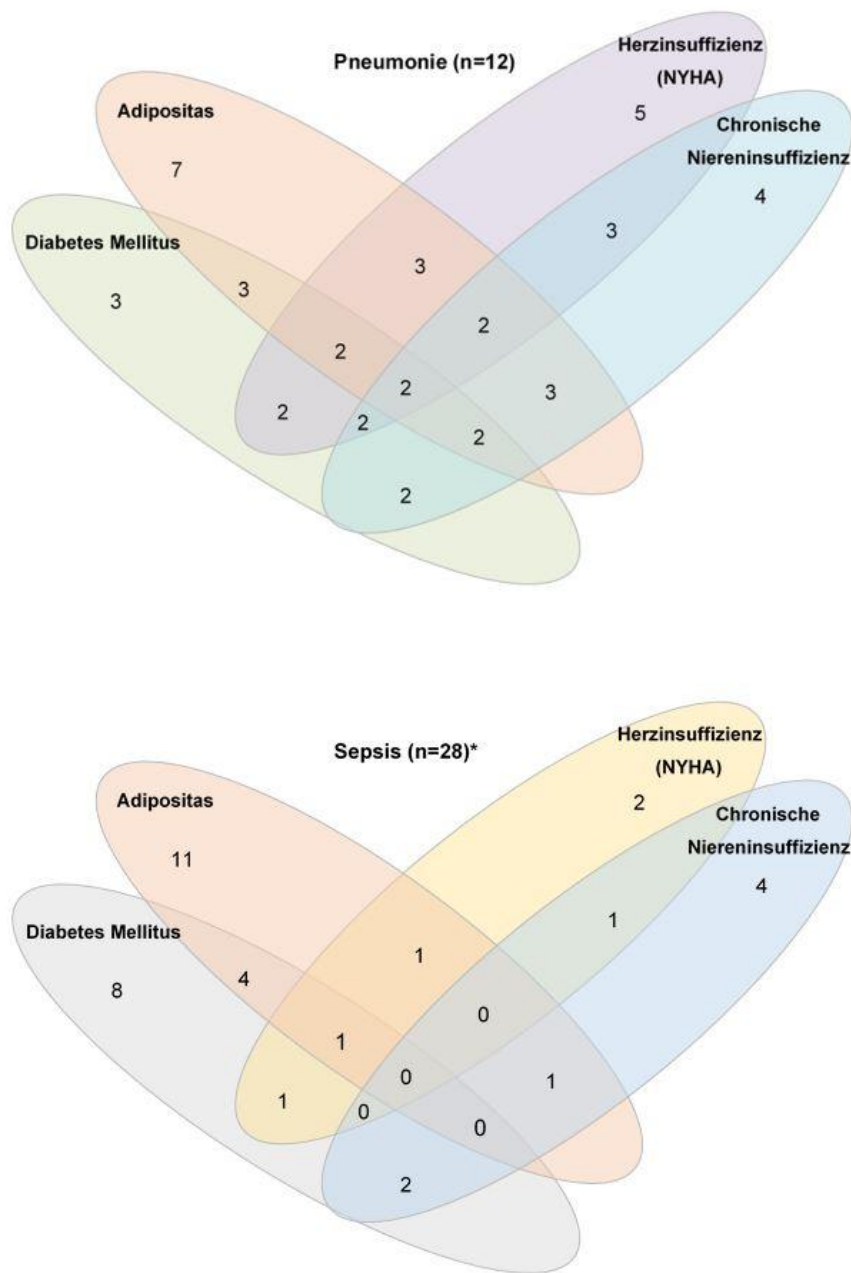


Abbildung 12. Komorbiditäten der Pneumonie und Sepsisgruppe. Anm.: Adipositas ist definiert als BMI $\geq 30,0$ kg/m², Diabetes Mellitus unabhängig vom Typ, Herzinsuffizienz ab NYHA I und Diagnose der chronischen Niereninsuffizienz aus Patientenakten entnommen. *Bei der Sepsiskohorte fehlten die Daten bezüglich der Adipositas eines Patienten und des NYHA-Stadiums von vier Patienten.

3.1.2 Klinische Parameter Pneumonie vs. Sepsis

Die Entzündungsparameter (Leukozyten, CRP, PCT und IL-6) an Tag 0 wurden zwischen der Pneumonie- und der Sepsisgruppe verglichen (s. Abbildung 13 und Abbildung 14, vgl. Tabelle 4). Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied aller Werte zwischen den Gruppen: Leukozyten (9,85 (SD = 4,76) vs. 15,36 (SD = 7,93) G/l; $p = 0,032$), Procalcitonin (0,18 (IQR = 0,13-0,68) vs. 4,7 (1,8-9,8) ng/ml; $p < 0,001$), CRP (11,25 (SD = 10,74) vs. 23,6 (SD = 10,75) mg/dl; $p = 0,002$) und IL-6 (26,0 (IQR = 13,0-64,0) vs. 289,0 (IQR = 102,8-2168,5) pg/ml; $p = 0,004$).

Die Thrombozytenzahl an Tag 0 unterschied sich nicht signifikant zwischen der Pneumonie und Sepsiskohorte ($p = 0,514$). Beide Gruppen zeigten einen Median von 221×10^3 Thrombozyten / μ l und befinden sich somit im Normalbereich von $150 - 350 \times 10^3$ Thrombozyten / μ l (keine Abbildung).

Laborchemische Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion (Kreatinin und Harnstoff) wurden ebenfalls zwischen den Gruppen verglichen. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Kreatinins (1,28 (SD = 1,15) vs. 1,5 (SD = 0,76) mg/dl, $p = 0,380$) und des Harnstoffes (48,0 (IQR = 26,0-111,0) vs. 52,5 (IQR = 36,0-82,5) mg/dl, $p = 0,571$).

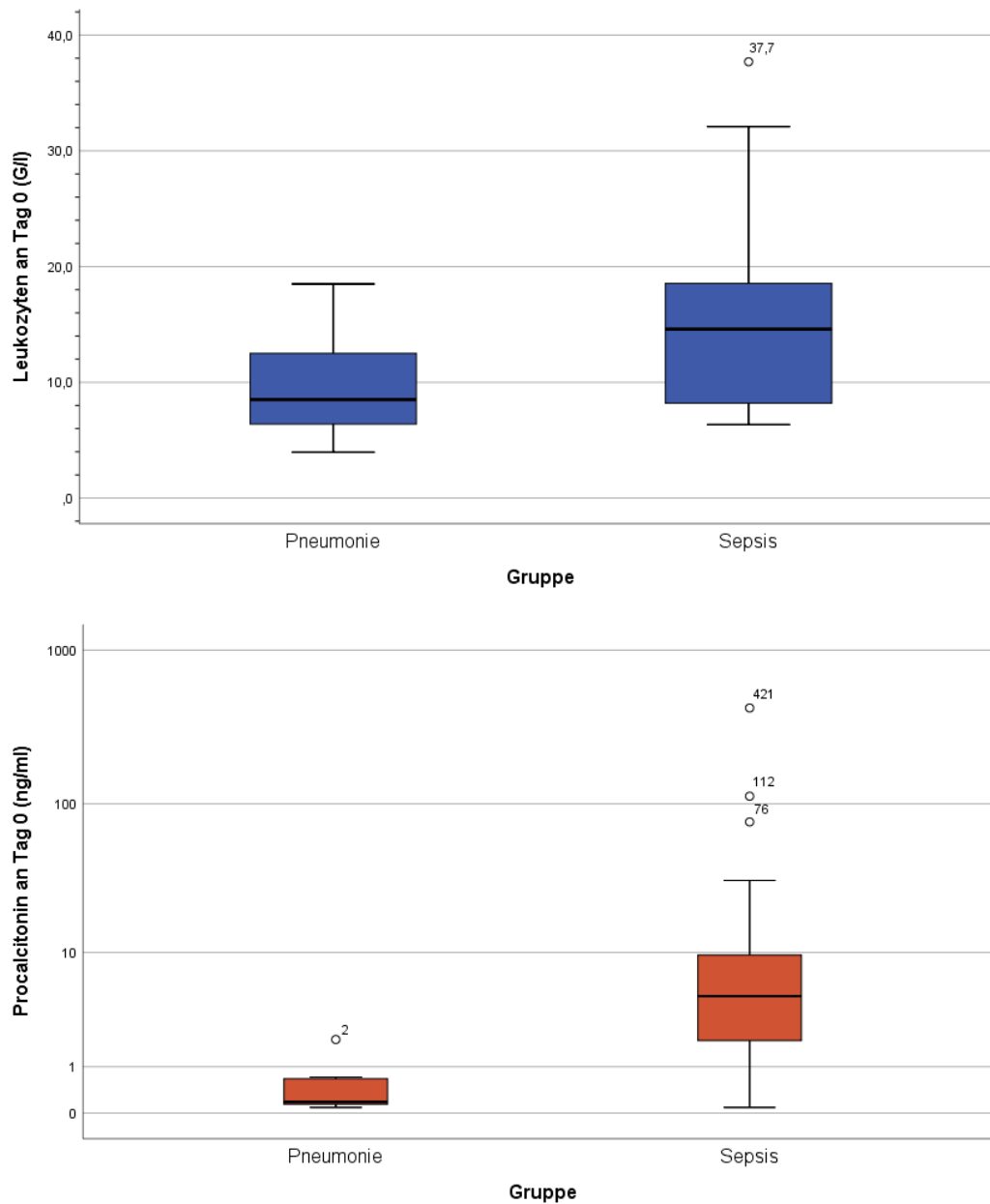


Abbildung 13. Pneumonie vs. Sepsis: Leukozyten und Procalcitonin an Tag 0. Auf der X-Achse sind jeweils die Gruppen Pneumonie und Sepsis abgebildet. Auf der Y-Achse der Entzündungsparameter in der jeweiligen Einheit. Die Skala bei Procalcitonin ist logarithmisch abgebildet. Der Boxplot ist folgendermaßen zu interpretieren: der Median (50. Perzentile) ist als schwarzer Strich im Boxplot aufgeführt. Die Box bildet sich aus dem oberen Rand (75. Perzentile) und unteren Rand (25. Perzentile). Der Rand rechts und links bildet den Interquartilbereich (IQR) ab (75. Perzentil-25. Perzentil). Werte die sich im obersten 25. Perzentil befinden werden durch einen senkrechten Strich mit Whisker gezeigt. Ausreißer werden mittels Kreise einzeln aufgeführt und der Wert wird angegeben. Zur besseren Darstellbarkeit wurden hier auch die Mediane für die Leukozyten verwendet.

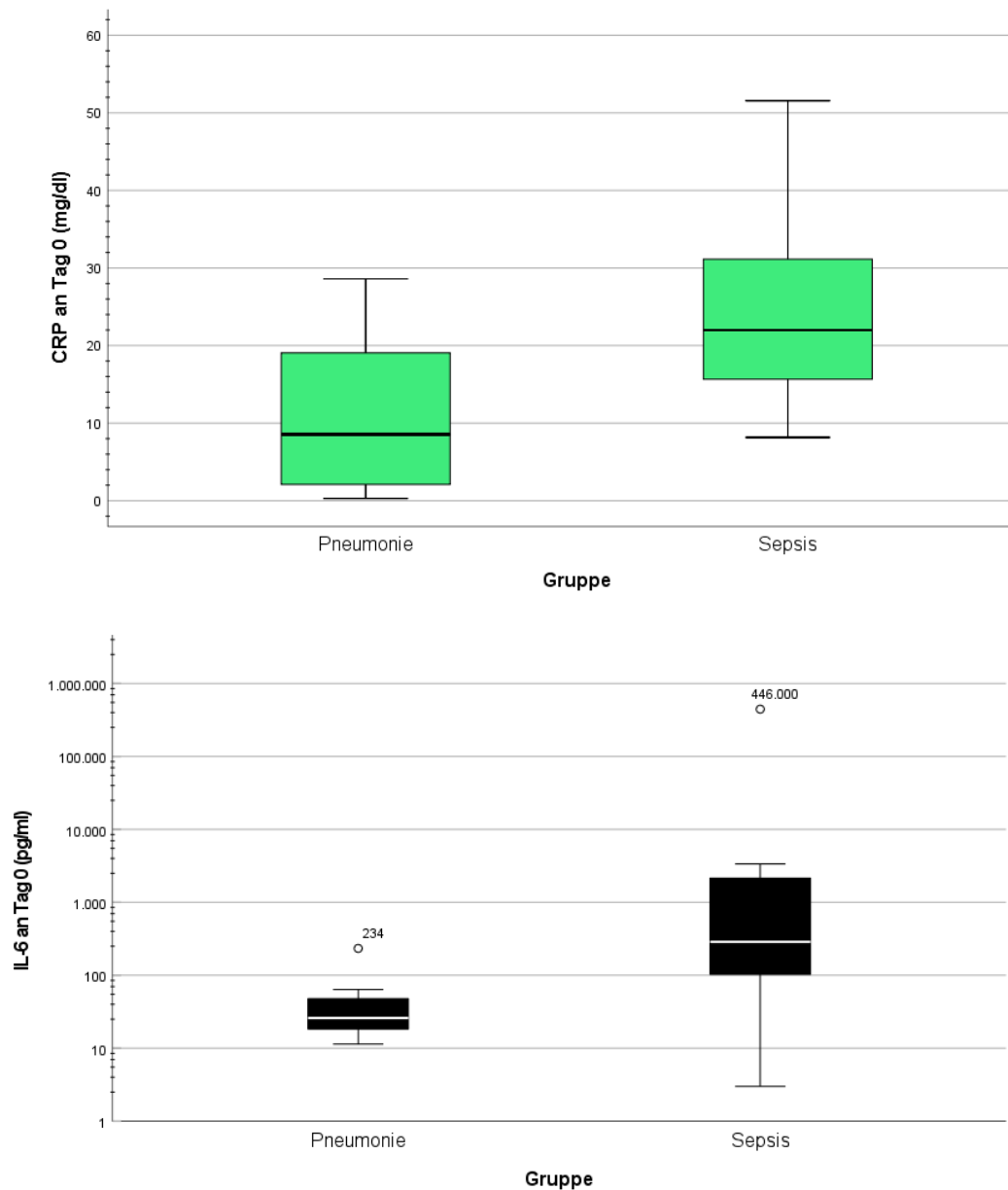


Abbildung 14. Pneumonie vs. Sepsis: CRP und IL-6 an Tag 0. Auf der X-Achse sind jeweils die Gruppen Pneumonie und Sepsis abgebildet. Auf der Y-Achse der Entzündungsparameter in der jeweiligen Einheit. Die Skala bei IL-6 ist logarithmisch abgebildet. Der Boxplot ist folgendermaßen zu interpretieren: der Median (50. Perzentile) ist als schwarzer Strich im Boxplot aufgeführt. Die Box bildet sich aus dem oberen Rand (75. Perzentile) und unteren Rand (25. Perzentile). Der Rand rechts und links bildet den Interquartilbereich (IQR) ab (75. Perzentil-25. Perzentil). Werte die sich im obersten 25. Perzentil befinden werden durch einen senkrechten Strich mit Whisker gezeigt. Ausreißer werden mittels Kreise einzeln aufgeführt und der Wert wird angegeben. Zur besseren Darstellbarkeit wurden hier auch die Mediane für das CRP verwendet. Abk.: CRP: C-reaktives Protein, IL-6: Interleukin 6.

3.1.3 Klinischer Verlauf der Sepsispatienten

Entzündungswerte wie die Leukozytenzahl, das Procalcitonin (PCT), das C-reaktive Protein (CRP), das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) und das Laktat werden zur Beurteilung des Verlaufs einer Infektion und das Ansprechen von Therapiemaßnahmen herangezogen.^{9, 47, 74} Deswegen ist es auch wichtig nicht nur einen einzelnen Wert, sondern dessen Verlauf zu bewerten.

Abbildung 15 zeigt den Verlauf der Leukozytenzahl, dem CRP und PCT in unserer Sepsiskohorte in den ersten 21 Tagen nach Studieneinschluss. Die Leukozytenzahl zeigt zwei Maxima, nämlich an Tag 0 (14,6 (IQR = 8,2 - 18,6) G/l) und Tag 10 (14,6 (IQR = 10,1 - 19,5) G/l). An Tag 14 (9,4 (IQR = 7,4 - 17,4) G/l) wird der laborinterne Normbereich (3,90 - 9,80 G/l) erreicht. Das CRP zeigt nach einem Anstieg innerhalb des ersten Tages mit einem Maximum von 23,5 (IQR = 16,7 - 32,5) mg/dl einen stetigen Abfall, jedoch ohne Erreichen des Normbereiches ($\leq 0,5$ mg/dl) innerhalb der beobachteten 21 Tage. Das Procalcitonin zeigt ebenfalls einen Anstieg an Tag 1 von 4,7 (IQR = 1,8 - 9,8) auf 5,0 (IQR = 3,1 - 12,5) ng/ml, fällt an Tag 14 auf ein Minimum von 0,33 (IQR = 0,31 - 3,0) ng/ml und steigt an Tag 21 wieder minimal an (0,6 (IQR = 0,1 - 4,1) ng/ml). Dabei wird während des Beobachtungszeitraumes der Normbereich ($\leq 0,1$ ng/ml) nicht erreicht.

Das Zytokin IL-6, fällt innerhalb der ersten 21 Tage nach Studieneinschluss der Sepsis, jedoch ohne Erreichen des laborinternen Normbereiches von $\leq 5,9$ pg/ml (s. Abbildung 16).

Ein erhöhter Laktatspiegel kann auf eine zelluläre Dysfunktion bei Sepsis hindeuten und wird zur Diagnostik eines septischen Schocks herangezogen.¹¹ Der Verlauf des Laktatspiegels unserer Sepsiskohorte (s. Abbildung 17), zeigt ein Maximum an Tag 0 von 2,65 (IQR = 1,6 - 4,12) mmol/l, ein Erreichen des Normbereiches (0,5 - 1,6 mmol/l) an Tag 4 (1,4 (IQR = 1,2 - 1,7) mmol/l) und einen minimalen Wert an Tag 14 (1,15 (IQR = 1,0 - 1,7) mmol/l).

Ein Patient der Sepsiskohorte ist hervorzuheben, der zu Beginn eine Pneumonie aufwies und während der Studie einen septischen Schock mit Reanimationspflichtigkeit entwickelte. Er zeigte Ausreißer des IL-6- (446 000 pg/ml) und PCT- (421,24 ng/ml) Wertes an Tag 0 und hatte stets einer der maximalen Score-Werte (beispielsweise SAPS II Tag 0 (83 Punkte), SOFA-Score an Tag 0 (21 Punkte) und APACHE II an Tag 1 (51 Punkte)). Seine CRP-Werte stiegen in der ersten vier Tagen nach Studieneinschluss (20,6 vs. 36,8 mg/dl), fielen zwischen den Tagen 7 bis 14 und zeigten an Tag 14 ein weiteres Maximum (42 mg/dl) nach erfolgter Reanimation zwischen Tag 10 und 14. Als Komorbiditäten wies der Patient eine chronisch obstruktive Lungenvorerkrankung sowie eine moderate Leberinsuffizienz auf. Er entwickelte in den ersten Tagen ein akutes dialysepflichtiges Nierenversagen und zeigte insgesamt einen

langen intensivmedizinischen Aufenthalt von 17 Tagen, verstarb während der Studie jedoch nicht.

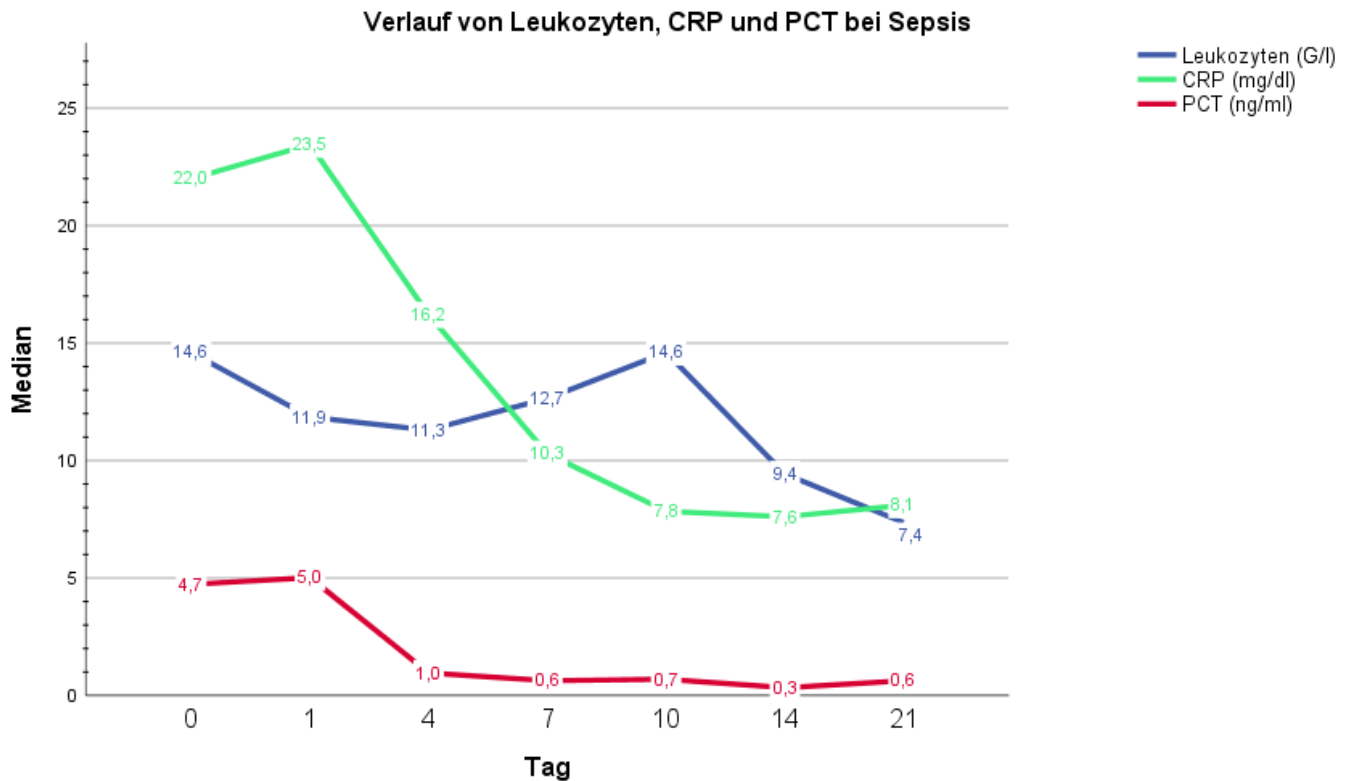


Abbildung 15. Verlauf der Entzündungswerte Leukozyten, CRP und PCT bei Sepsis in den ersten 21 Tagen. Zu sehen ist die Zeitangabe auf der x-Achse in Tagen und der Median des entsprechenden Laborwertes auf der y-Achse. Verlauf der Leukozytenzahl (blau), des C-reaktiven Proteins (CRP, grün) und Procalcitonins (PCT, rot). Die Leukozytenzahl zeigt einen zweigipfligen Verlauf mit zwei Maxima an Tag 0 und Tag 10, jedoch mit Erreichen des laborinternen Normbereiches (3,90 - 9,80 G/l) an Tag 14. Das CRP zeigt nach einem Anstieg innerhalb des ersten Tages einen stetigen Abfall, jedoch ohne Erreichen des Normbereiches ($\leq 0,5$ mg/dl) innerhalb der 21 Tage. Das Procalcitonin zeigt ebenfalls einen Anstieg an Tag 1, fällt dann auf ein Minimum an Tag 14 mit einem minimalen Anstieg an Tag 21, ohne Erreichens des Normbereiches ($\leq 0,1$ ng/ml).

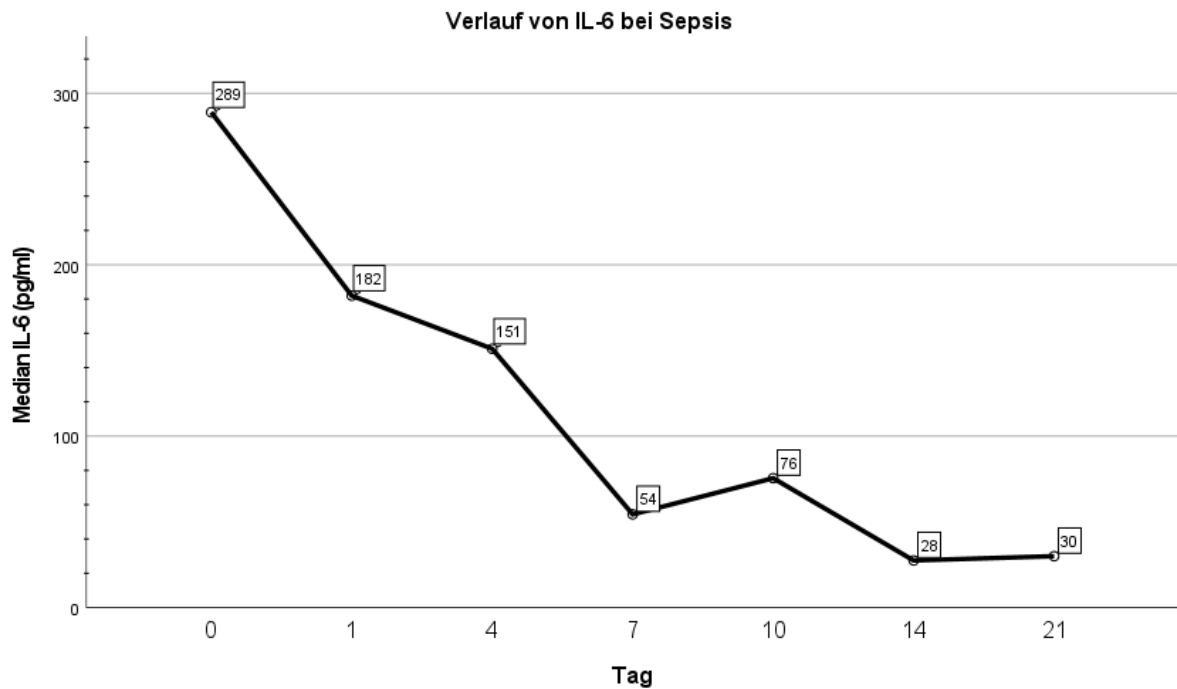


Abbildung 16. Verlauf des IL-6-Wertes bei Sepsis in den ersten 21 Tagen. Deutlich wird ein Abwärtstrend des IL-6 innerhalb der ersten 21 Tage nach Erstdiagnose der Sepsis, jedoch ohne Erreichen des laborinternen Normbereiches ($\leq 5,9$ pg/ml).

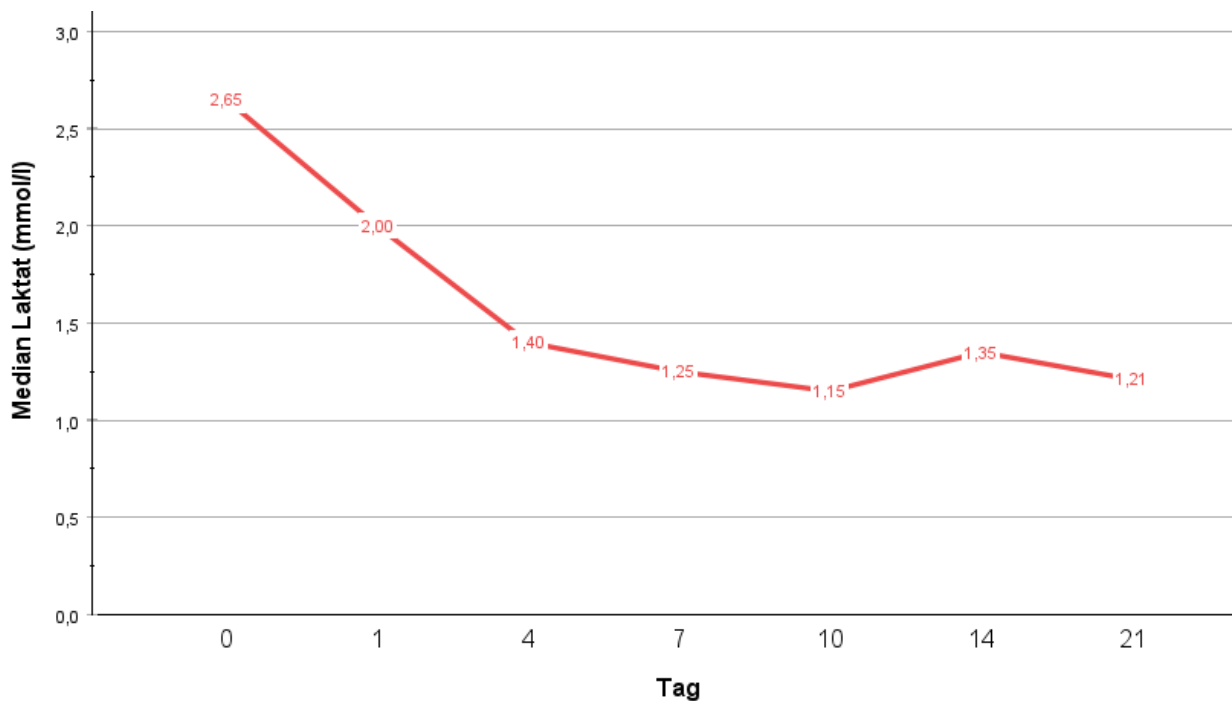


Abbildung 17. Verlauf der Laktatwerte bei Sepsis in den ersten 21 Tagen. Der Verlauf des Laktatspiegels zeigt ein Maximum an Tag 0 und im Verlauf einen Abfall mit einem Minimum an Tag 10 und einem kleinen Anstieg an Tag 14. Der Normbereich (0,5 - 1,6 mmol/l) wird an Tag 4 erreicht.

Zur Beurteilung eines Sepsispatienten können bei Erstaufnahme, sowie im weiteren Verlauf, Scores erhoben werden. Der SOFA-Score, wie auch der MODS, sind klinische Tools zur Evaluierung der Organdysfunktion bzw. des Organversagens. Anders als z. B. beim APACHE II-Score, der zur Mortalitätsprognose verwendet wird, werden diese beiden zur Beurteilung von Organfunktionen und Morbidität herangezogen. Der klinische Verlauf der Sepsis, die zu Organversagen führen kann, ist ein dynamischer Prozess, der immer wieder überprüft werden sollte.⁷⁵ Abbildung 18 zeigt den Verlauf der Scores bei unserer Sepsiskohorte in den ersten 7 Tagen nach Erstdiagnose. Der SOFA-Score an Tag 0 ist nicht normalverteilt, weswegen hier die Angabe des Medians erfolgt. Zur besseren Vergleichbarkeit werden die anderen Tage und Scores ebenfalls als Median angegeben. An Tag 0 beträgt der Median 11,5 Punkte (IQR = 9,0 - 13,0), and Tag 1 10 Punkte (IQR = 8,0 - 12,5) und fällt bis zu Tag 7 auf 7,5 Punkte (IQR = 4,0 - 9,0) ab. Dies entspricht einem Abfall von 34,8% innerhalb von 7 Tagen. Der MODS zeigt an Tag 0 einen Median von 8 Punkten (IQR = 5,0 - 11,0) und an Tag 1 einen Wert von 7 Punkten (IQR = 5,0 - 9,0) an. An Tag 7 ergibt die Berechnung einen Wert von 4,5 Punkten (IQR = 2,25 - 8,0). Dies entspricht einem Abfall von 43,75% im Vergleich zum Tag 0. Der APACHE II Score zeigt innerhalb der ersten 24 Stunden einen Abfall von 1,5 Punkten (Tag 0: 23 Punkte (IQR = 15,0 - 31,0) und Tag 1 einen Wert von 21,5 Punkten (IQR = 13,0 - 28,25), was einen Abfall von 6,5% entspricht. An Tag 7 ergibt der Median 17,5 Punkte (IQR = 11,25 - 25,5), was einen Abfall von 24% im Vergleich zum Tag 0 entspricht.

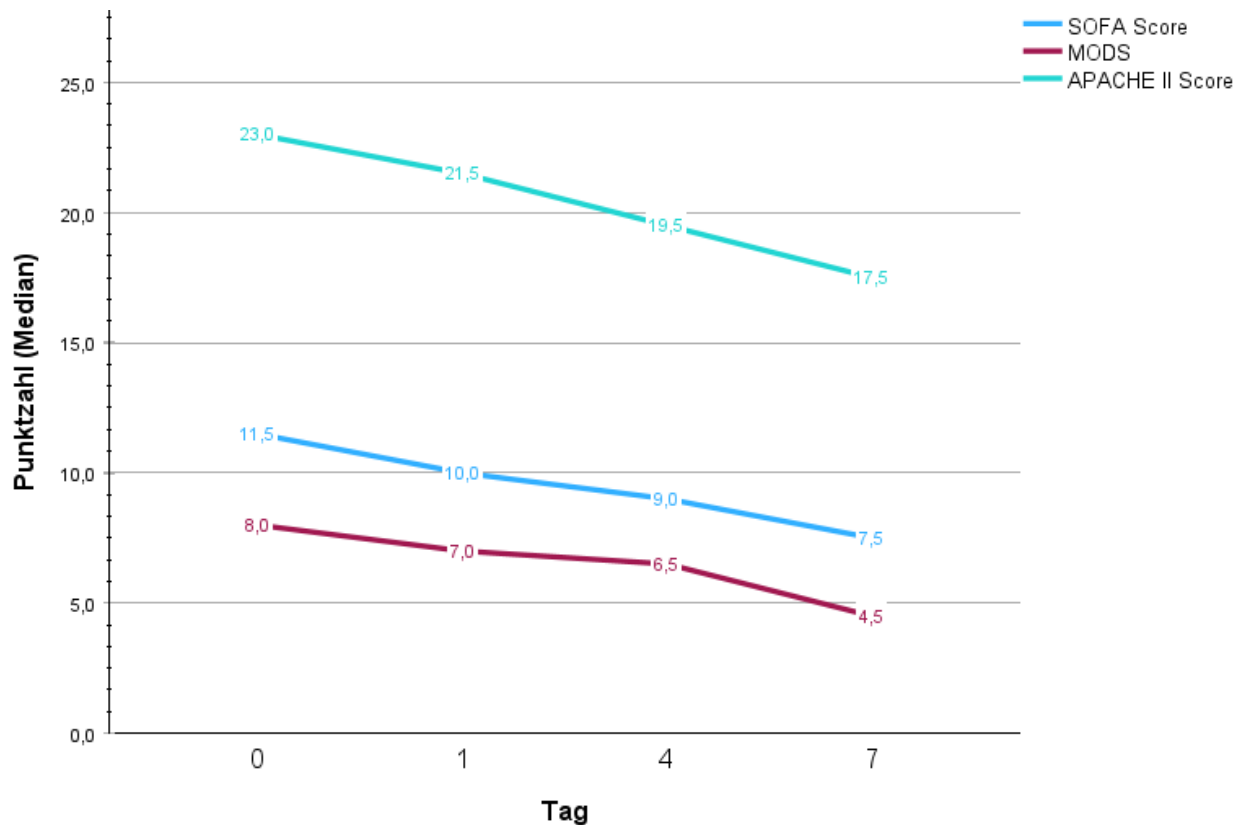


Abbildung 18. Verlauf SOFA-, APACHE II-Score und MODS bei Sepsis. Aufgeführt sind drei klinisch angewendete Scores bei Sepsis: SOFA-Score (blau), APACHE II- Score (rot) und MODS (grün). Auf der x-Achse sind die Tage nach Erstdiagnose und auf der y-Achse die Punktzahl-Mediane des jeweiligen Tages aufgeführt. Zwar wurden die Scores auch für die Tage 10, 14 und 21 aufgezeichnet, jedoch haben für die Mehrheit der Patienten die Eintragung gefehlt, weswegen sie hier nicht aufgeführt werden. Es ist ein deutlicher Abwärtstrend der Scores innerhalb der ersten Woche nach Therapiebeginn zu verzeichnen. Abk.: SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; APACHE II: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II; MODS: Multiple Organ Dysfunction Score

3.2 Probenausbeute

Die mediane extrahierte Gesamtmenge der RNA aus 1 ml Serum über alle drei Gruppen hinweg lag bei 11,45 (4,67 - 24,10) ng. Die mediane Gesamtmenge der RNA, die mittels miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) extrahiert werden konnte, war bei der Pneumoniegruppe 11,26 (2,73 - 30,71) ng, bei der Sepsisgruppe 20,04 (11,94 - 64,60) ng und für die Volunteer-Gruppe 7,26 (1,00 - 11,45) ng. Die durch das FastQC überprüfte Qualität erreichte stets einen medianen Phred Score von 38 oder 40.

3.2.1 miRNAs

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der gesamt RNA-Seq Analyse sollte vor weiteren Schritten untersucht werden. Diese sollte hoch sein (Spearman $R^2 > 0,9$), damit erwartet werden kann, dass die Proben einer Gruppe (Pneumonie, Sepsis und Volunteers) in der PCA (*engl.* principal component analysis) geclustert werden.⁶⁶ Die Clusterung bedeutet, dass es Expressionsunterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen, nicht jedoch zwischen den einzelnen Teilnehmer innerhalb einer Gruppe, gibt. Die PCA unserer Arbeitsgruppe zeigte bei der Analyse der 500 miRNAs mit der größten Varianz, dass Sepsispatienten von Volunteers genauer getrennt werden können als im Vergleich zu Pneumoniepatienten (Ergebnisse nicht abgebildet).⁷⁶

3.2.1.1 Pneumoniepatienten vs. Volunteers

Zunächst erfolgte der Vergleich der miRNA-Expressionsprofile zwischen den verschiedenen Kohorten nur anhand der vorher bestimmten Filterkriterien ($\text{baseMean} \geq 50$, signifikanter Log_2FC sowie $p\text{-adj} < 0,05$). Hier erbrachte der Vergleich zwischen den Pneumoniepatienten und den Volunteers (gesunden Probanden) 27 signifikant regulierte miRNAs hervor (s. Tabelle 5 und Abbildung 19), darunter 12 hochregulierte und 15 runterregulierte miRNAs.

Hierbei zeigten sich folgende fünf miRNA in der Pneumoniekohorte am höchsten hochreguliert (Angabe: miRNAs ($\text{log}_2\text{FoldChange}$)): miR-432-5p (1,58), miR-493-3p (1,53), miR-4732-5p (1,31), miR-495-3p (1,28) und miR-199a-5p (1,25).

Folgende fünf miRNA wurden in der Pneumoniekohorte gegenüber der Volunteergruppe am meisten runterreguliert: miR-193b-5p (-1,61), miR-542-3p (-1,71), miR-885-5p (-1,78), miR-193a-5p (-2,00) und miR-582-3p (-2,20).

miRNA	baseMean	log2FC	lfcSE	stat	p-Wert	p-adj
hsa-miR-432-5p	326,39	1,58	0,39	4,07	0,0000	0,0020
hsa-miR-493-3p	82,98	1,53	0,41	3,75	0,0002	0,0049
hsa-miR-4732-5p	119,91	1,31	0,36	3,66	0,0003	0,0058
hsa-miR-495-3p	78,28	1,28	0,36	3,59	0,0003	0,0071
hsa-miR-199a-5p	273,61	1,25	0,28	4,50	0,0000	0,0004
hsa-miR-4446-3p	76,67	1,20	0,43	2,78	0,0054	0,0469
hsa-miR-335-3p	65,26	1,11	0,34	3,29	0,0010	0,0147
hsa-let-7b-5p	21888,05	1,08	0,35	3,07	0,0022	0,0242
hsa-miR-127-3p	107,18	1,07	0,30	3,57	0,0004	0,0071
hsa-miR-543	777,64	1,07	0,36	2,96	0,0031	0,0302
hsa-miR-381-3p	338,16	1,05	0,38	2,77	0,0056	0,0469
hsa-miR-379-5p	98,47	1,04	0,31	3,29	0,0010	0,0147
hsa-miR-450a-5p	60,41	-1,01	0,28	-3,58	0,0003	0,0071
hsa-miR-27a-5p	92,88	-1,06	0,32	-3,37	0,0008	0,0127
hsa-miR-27a-3p	15110,34	-1,08	0,20	-5,30	0,0000	0,0000
hsa-miR-148a-3p	333993,48	-1,12	0,29	-3,81	0,0001	0,0048
hsa-miR-223-5p	5522,36	-1,12	0,27	-4,17	0,0000	0,0014
hsa-let-7b-3p	157,69	-1,17	0,24	-4,92	0,0000	0,0001
hsa-miR-145-3p	413,82	-1,24	0,25	-5,02	0,0000	0,0001
hsa-miR-450b-5p	93,27	-1,29	0,29	-4,46	0,0000	0,0004
hsa-miR-338-5p	260,70	-1,31	0,24	-5,38	0,0000	0,0000
hsa-miR-452-5p	77,90	-1,40	0,39	-3,64	0,0003	0,0062
hsa-miR-193b-5p	85,69	-1,61	0,43	-3,73	0,0002	0,0049
hsa-miR-542-3p	74,97	-1,71	0,31	-5,57	0,0000	0,0000
hsa-miR-885-5p	75,44	-1,78	0,57	-3,12	0,0018	0,0223
hsa-miR-193a-5p	1371,81	-2,00	0,30	-6,75	0,0000	0,0000
hsa-miR-582-3p	587,44	-2,20	0,36	-6,19	0,0000	0,0000

Tabelle 5. Die 27 signifikant regulierten miRNAs zwischen Patienten mit einer ambulant erworbenen Pneumonie und gesunden Probanden (Volunteers). Die miRNAs sind anhand ihres Log2FoldChange (log2FC) in absteigender Reihenfolge gelistet. MiRNAs mit einem positiven log2FC sind in der Pneumoniegruppe hochreguliert (grau hinterlegt), miRNAs mit einem negativen log2FC sind hingegen runterreguliert (weiß hinterlegt). Abk.: lfcSE: Standardfehler des Log2FC, stat: Wald-Test Statistik, p-Wert: des Wald-Test, p-adj: Benjamini-Hochberg angepasster p-Wert.

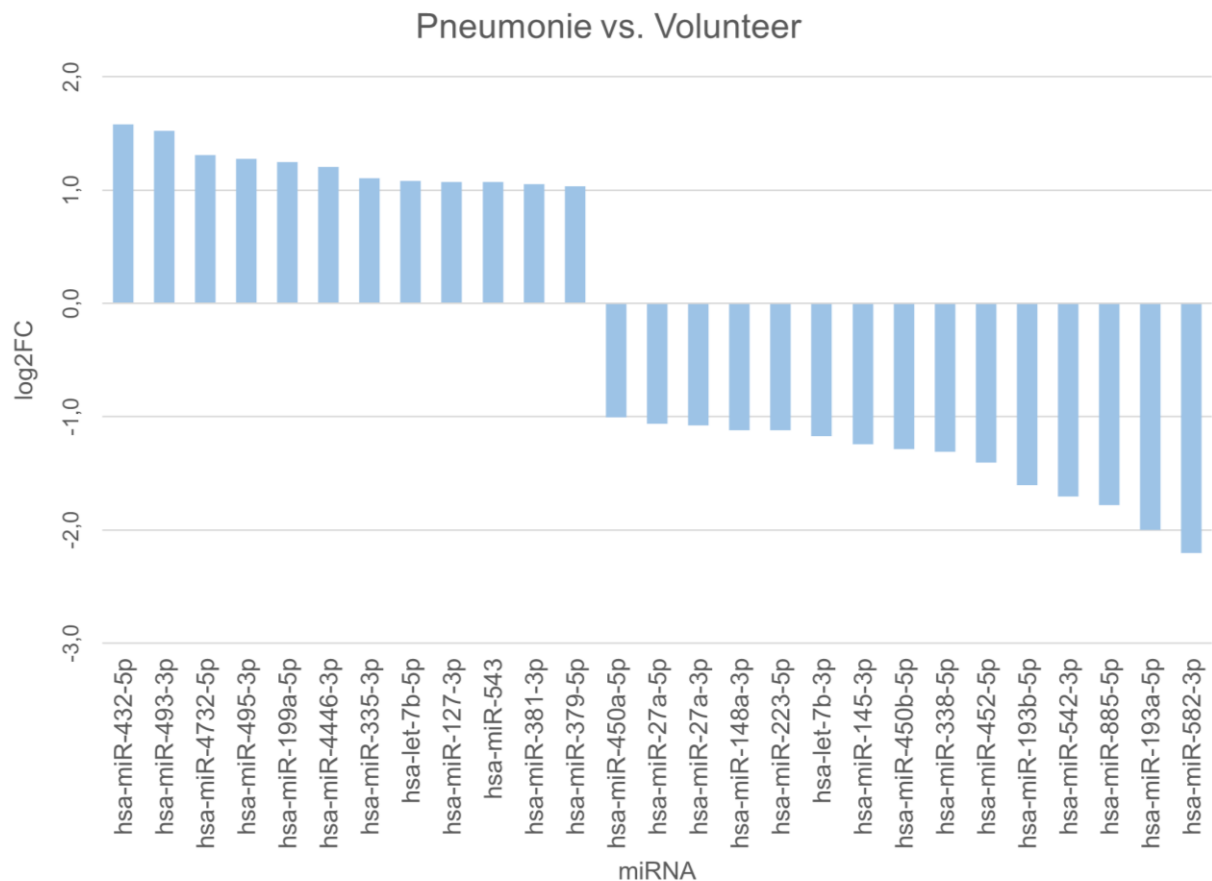


Abbildung 19. Log2 Fold Change der signifikant veränderten miRNAs zwischen ambulant erworbener Pneumonie und Volunteers. Zu sehen ist der log2FoldChange (log2FC) der 27 signifikant verändert exprimierten miRNAs in der Pneumoniegruppe gegenüber der Volunteerkohorte. Zur Interpretation: die miR-432-5p ist in der Pneumoniegruppe mit einem log2FC von 1,58 etwa dreimal so häufig exprimiert wie in der Volunteergruppe ($2^{1,58} = 2,99$), während die miR-582-3p mit einem log2FC von -2,2 ($2^{-2,2} = 0,22$) im Vergleich etwa fünf Mal weniger exprimiert wird.

3.2.1.2 Sepsispatienten vs. Volunteer

Die Analyse brachte weiterhin 66 verändert exprimierte miRNAs zwischen der Sepsis- und der Volunteergruppe (s. Tabelle 6 und Abbildung 20) darunter 34 hochregulierte und 32 runterregulierte miRNAs.

miRNA	baseMean	log2FC	lfcSE	stat	p-Wert	p-adj
hsa-miR-4433b-3p	288,49	4,34	0,62	7,02	0,0000	0,0000
hsa-miR-4446-3p	76,67	3,53	0,47	7,44	0,0000	0,0000
hsa-miR-1228-5p	59,06	3,27	0,88	3,74	0,0002	0,0021
hsa-miR-199a-5p	273,61	2,19	0,30	7,40	0,0000	0,0000
hsa-miR-370-3p	265,74	2,10	0,38	5,49	0,0000	0,0000
hsa-miR-493-3p	82,98	2,10	0,43	4,84	0,0000	0,0000
hsa-miR-432-5p	326,39	2,09	0,41	5,06	0,0000	0,0000
hsa-miR-4732-5p	119,91	2,06	0,38	5,40	0,0000	0,0000
hsa-miR-485-5p	94,20	1,90	0,41	4,57	0,0000	0,0001
hsa-miR-495-3p	78,28	1,85	0,38	4,88	0,0000	0,0000
hsa-let-7e-5p	195,68	1,78	0,35	5,04	0,0000	0,0000
hsa-miR-335-3p	65,26	1,68	0,36	4,69	0,0000	0,0001
hsa-miR-409-3p	1488,93	1,67	0,36	4,66	0,0000	0,0001
hsa-miR-379-5p	98,47	1,67	0,34	4,96	0,0000	0,0000
hsa-miR-485-3p	62,68	1,66	0,56	2,95	0,0031	0,0209
hsa-miR-342-5p	256,23	1,64	0,36	4,60	0,0000	0,0001
hsa-miR-381-3p	338,16	1,63	0,40	4,02	0,0001	0,0007
hsa-miR-423-5p	24114,11	1,62	0,35	4,70	0,0000	0,0001
hsa-miR-4433b-5p	104,60	1,51	0,49	3,09	0,0020	0,0146
hsa-miR-11400	169,78	1,49	0,33	4,47	0,0000	0,0002
hsa-miR-224-5p	229,54	1,48	0,36	4,12	0,0000	0,0006
hsa-miR-543	777,64	1,47	0,38	3,82	0,0001	0,0015
hsa-let-7b-5p	21888,05	1,46	0,37	3,91	0,0001	0,0011
hsa-miR-654-3p	150,59	1,46	0,36	4,02	0,0001	0,0007
hsa-miR-127-3p	107,18	1,36	0,32	4,27	0,0000	0,0003
hsa-miR-340-3p	86,03	1,27	0,32	3,98	0,0001	0,0008
hsa-miR-374a-5p	66,00	1,26	0,27	4,64	0,0000	0,0001
hsa-miR-151a-3p	28081,60	1,15	0,28	4,10	0,0000	0,0006
hsa-miR-323b-3p	67,28	1,14	0,40	2,89	0,0039	0,0245
hsa-miR-134-5p	329,15	1,06	0,34	3,11	0,0019	0,0139
hsa-miR-744-5p	1180,20	1,06	0,23	4,63	0,0000	0,0001
hsa-miR-26a-5p	18127,77	1,06	0,23	4,67	0,0000	0,0001
hsa-miR-1908-5p	116,10	1,04	0,34	3,10	0,0019	0,0143
hsa-miR-144-3p	767,76	1,01	0,30	3,39	0,0007	0,0062
hsa-miR-155-5p	238,58	-1,00	0,28	-3,56	0,0004	0,0038
hsa-miR-125b-5p	889,46	-1,02	0,34	-3,03	0,0024	0,0168
hsa-miR-29a-3p	1638,73	-1,03	0,33	-3,14	0,0017	0,0131
hsa-miR-192-5p	6252,24	-1,05	0,40	-2,64	0,0082	0,0439
hsa-miR-27b-3p	7554,04	-1,09	0,33	-3,30	0,0010	0,0083

hsa-miR-378d	119,52	-1,10	0,26	-4,17	0,0000	0,0005
hsa-miR-125a-3p	51,92	-1,12	0,29	-3,93	0,0001	0,0011
hsa-miR-223-5p	5522,36	-1,14	0,28	-4,02	0,0001	0,0007
hsa-miR-502-3p	135,67	-1,15	0,25	-4,57	0,0000	0,0001
hsa-miR-99a-5p	30102,77	-1,17	0,41	-2,88	0,0039	0,0245
hsa-miR-30a-5p	2719,20	-1,24	0,36	-3,43	0,0006	0,0058
hsa-miR-30a-3p	242,44	-1,26	0,30	-4,15	0,0000	0,0005
hsa-miR-582-3p	587,44	-1,32	0,38	-3,49	0,0005	0,0049
hsa-miR-503-5p	167,45	-1,35	0,25	-5,48	0,0000	0,0000
hsa-miR-122-5p	176519,71	-1,44	0,54	-2,65	0,0081	0,0436
hsa-miR-27a-5p	92,88	-1,47	0,33	-4,42	0,0000	0,0002
hsa-miR-148a-3p	333993,48	-1,47	0,31	-4,72	0,0000	0,0001
hsa-miR-378c	72,35	-1,56	0,30	-5,27	0,0000	0,0000
hsa-miR-378i	117,41	-1,68	0,29	-5,73	0,0000	0,0000
hsa-miR-450b-5p	93,27	-1,69	0,30	-5,59	0,0000	0,0000
hsa-miR-193b-5p	85,69	-1,72	0,46	-3,77	0,0002	0,0018
hsa-miR-338-5p	260,70	-1,75	0,26	-6,80	0,0000	0,0000
hsa-miR-500a-3p	94,58	-1,76	0,33	-5,32	0,0000	0,0000
hsa-miR-378a-3p	3015,25	-1,79	0,26	-6,77	0,0000	0,0000
hsa-miR-452-5p	77,90	-1,79	0,41	-4,41	0,0000	0,0002
hsa-miR-499a-5p	138,33	-1,88	0,45	-4,17	0,0000	0,0005
hsa-miR-542-3p	74,97	-1,95	0,32	-6,05	0,0000	0,0000
hsa-miR-95-3p	93,17	-2,01	0,41	-4,88	0,0000	0,0000
hsa-miR-1246	523,70	-2,12	0,50	-4,27	0,0000	0,0003
hsa-miR-511-5p	486,95	-2,13	0,38	-5,56	0,0000	0,0000
hsa-miR-193a-5p	1371,81	-2,48	0,31	-7,89	0,0000	0,0000
hsa-miR-885-5p	75,44	-2,73	0,60	-4,54	0,0000	0,0001

Tabelle 6. Die 66 signifikant regulierten miRNAs zwischen Patienten mit einer Sepsis und gesunden Probanden (Volunteer). Die miRNAs sind anhand ihres Log2FoldChanges (log2FC) in absteigender Reihenfolge gelistet. Die in der Sepsisgruppe hochregulierten miRNAs mit einem positiven log2FC sind grau hinterlegt, während die runterregulierten miRNAs mit einem negativen log2FC weiß hinterlegt sind. Abk.: lfcSE: Standardfehler des Log2FC, stat: Wald-Test Statistik, p-Wert: des Wald-Test, p- adj: Benjamini-Hochberg angepasster p-Wert.

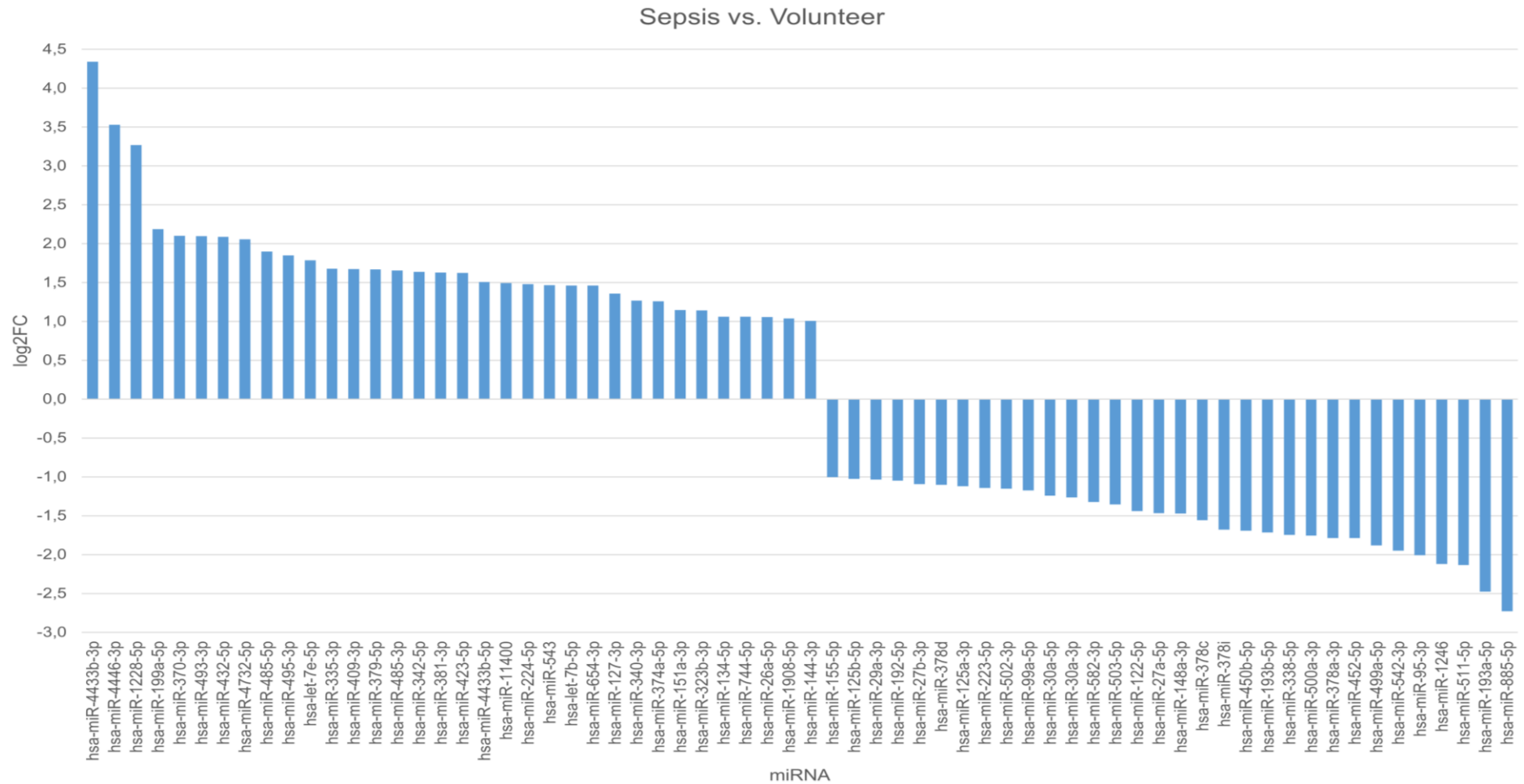


Abbildung 20. Log2FoldChange der signifikant veränderten miRNAs zwischen Patienten mit Sepsis und gesunden Probanden (Volunteers). Zu sehen ist der log2FoldChange (log2FC) der 66 signifikant veränderten exprimierten miRNAs der Sepsisgruppe gegenüber der Volunteerkohorte. Zur Interpretation: Die miRNA-4433b-3p ist mit einem log2FC von 4,34 ($2^{4,34} = 20,25$) etwa zwanzig Mal so häufig in der Sepsisgruppe exprimiert wie in der Volunteergruppe. Die miR-885-5p ist mit einem log2FC von -2,73 ($2^{-2,73} = 0,15$) etwa sechs-bis siebenfach weniger exprimiert.

Wir haben zusätzlich die Volunteergruppe mit denjenigen Sepsispatienten verglichen, die einen septischen Schock hatten. Dies erbrachte 78 verändert exprimierte miRNAs hervor, darunter 28 hochregulierte und 50 runterregulierte miRNAs (s. Tabelle 7 und Abbildung 21).

miRNA	baseMean	Log2FC	lfcSE	stat	pvalue	padj
hsa-miR-1228-5p	59,06	4,08	0,55	7,48	0,0000	0,0000
hsa-miR-4433b-3p	288,49	3,85	0,38	10,02	0,0000	0,0000
hsa-miR-4446-3p	76,67	3,57	0,29	12,29	0,0000	0,0000
hsa-miR-432-5p	326,39	2,30	0,26	8,94	0,0000	0,0000
hsa-miR-370-3p	265,74	2,30	0,24	9,63	0,0000	0,0000
hsa-miR-4732-5p	119,91	2,17	0,24	9,18	0,0000	0,0000
hsa-miR-199a-5p	273,61	2,08	0,18	11,32	0,0000	0,0000
hsa-miR-493-3p	82,98	1,98	0,27	7,41	0,0000	0,0000
hsa-miR-423-5p	24114,11	1,91	0,22	8,80	0,0000	0,0000
hsa-miR-485-5p	94,20	1,84	0,26	7,14	0,0000	0,0000
hsa-miR-543	777,64	1,83	0,24	7,60	0,0000	0,0000
hsa-let-7b-5p	21888,05	1,79	0,23	7,64	0,0000	0,0000
hsa-let-7e-5p	195,68	1,77	0,22	8,03	0,0000	0,0000
hsa-miR-495-3p	78,28	1,68	0,23	7,17	0,0000	0,0000
hsa-miR-485-3p	62,68	1,67	0,35	4,80	0,0000	0,0000
hsa-miR-342-5p	256,23	1,63	0,22	7,32	0,0000	0,0000
hsa-miR-409-3p	1488,93	1,60	0,22	7,13	0,0000	0,0000
hsa-miR-381-3p	338,16	1,58	0,25	6,25	0,0000	0,0000
hsa-miR-335-3p	65,26	1,35	0,22	6,16	0,0000	0,0000
hsa-miR-4433b-5p	104,60	1,35	0,30	4,45	0,0000	0,0000
hsa-miR-379-5p	98,47	1,33	0,21	6,42	0,0000	0,0000
hsa-miR-744-5p	1180,20	1,32	0,14	9,22	0,0000	0,0000
hsa-miR-11400	169,78	1,23	0,21	5,92	0,0000	0,0000
hsa-miR-654-3p	150,59	1,16	0,23	5,11	0,0000	0,0000
hsa-miR-151a-3p	28081,60	1,15	0,18	6,54	0,0000	0,0000
hsa-miR-127-3p	107,18	1,04	0,20	5,29	0,0000	0,0000
hsa-miR-374a-5p	66,00	1,04	0,17	6,27	0,0000	0,0000
hsa-miR-3158-3p	468,37	1,03	0,26	3,90	0,0001	0,0004
hsa-miR-145-3p	413,82	-1,01	0,16	-6,12	0,0000	0,0000
hsa-miR-125a-3p	51,92	-1,03	0,18	-5,72	0,0000	0,0000
hsa-miR-660-5p	59,21	-1,04	0,18	-5,64	0,0000	0,0000
hsa-miR-122-5p	176519,71	-1,05	0,34	-3,09	0,0020	0,0064
hsa-miR-223-5p	5522,36	-1,06	0,18	-5,92	0,0000	0,0000
hsa-miR-194-5p	1538,24	-1,07	0,22	-4,77	0,0000	0,0000
hsa-miR-200a-3p	214,07	-1,07	0,26	-4,06	0,0000	0,0002
hsa-miR-27a-5p	92,88	-1,11	0,21	-5,28	0,0000	0,0000
hsa-miR-191-5p	8268,75	-1,11	0,25	-4,40	0,0000	0,0001
hsa-miR-378d	119,52	-1,11	0,17	-6,71	0,0000	0,0000
hsa-miR-499a-5p	138,33	-1,13	0,28	-3,97	0,0001	0,0003
hsa-miR-361-5p	129,02	-1,13	0,13	-8,37	0,0000	0,0000

Tabelle 7. Fortsetzung nächste Seite

hsa-miR-181b-5p	583,34	-1,17	0,14	-8,50	0,0000	0,0000
hsa-miR-503-5p	167,45	-1,17	0,16	-7,53	0,0000	0,0000
hsa-miR-192-5p	6252,24	-1,19	0,25	-4,80	0,0000	0,0000
hsa-miR-182-5p	1375,18	-1,24	0,22	-5,52	0,0000	0,0000
hsa-miR-29a-3p	1638,73	-1,24	0,21	-6,02	0,0000	0,0000
hsa-miR-155-5p	238,58	-1,25	0,18	-7,10	0,0000	0,0000
hsa-miR-100-5p	1862,06	-1,27	0,24	-5,37	0,0000	0,0000
hsa-miR-206	373,27	-1,31	0,40	-3,28	0,0010	0,0036
hsa-miR-130b-3p	62,61	-1,38	0,22	-6,22	0,0000	0,0000
hsa-miR-582-3p	587,44	-1,39	0,24	-5,88	0,0000	0,0000
hsa-miR-125b-5p	889,46	-1,40	0,21	-6,60	0,0000	0,0000
hsa-miR-502-3p	135,67	-1,41	0,16	-8,90	0,0000	0,0000
hsa-miR-378c	72,35	-1,41	0,19	-7,58	0,0000	0,0000
hsa-miR-30a-3p	242,44	-1,41	0,19	-7,40	0,0000	0,0000
hsa-miR-30c-5p	858,30	-1,43	0,27	-5,21	0,0000	0,0000
hsa-miR-203a-3p	123,51	-1,44	0,27	-5,35	0,0000	0,0000
hsa-miR-148a-3p	333993,48	-1,46	0,20	-7,49	0,0000	0,0000
hsa-miR-152-3p	536,96	-1,48	0,25	-5,89	0,0000	0,0000
hsa-miR-193b-5p	85,69	-1,48	0,29	-5,16	0,0000	0,0000
hsa-miR-378i	117,41	-1,57	0,18	-8,53	0,0000	0,0000
hsa-miR-200c-3p	93,90	-1,57	0,26	-6,03	0,0000	0,0000
hsa-miR-99a-5p	30102,77	-1,59	0,26	-6,24	0,0000	0,0000
hsa-miR-27b-3p	7554,04	-1,62	0,21	-7,81	0,0000	0,0000
hsa-miR-3168	18285,99	-1,67	0,52	-3,18	0,0015	0,0049
hsa-miR-378a-3p	3015,25	-1,68	0,17	-10,18	0,0000	0,0000
hsa-miR-1-3p	1124,13	-1,70	0,33	-5,20	0,0000	0,0000
hsa-miR-450b-5p	93,27	-1,79	0,19	-9,40	0,0000	0,0000
hsa-miR-200b-3p	71,49	-1,80	0,24	-7,43	0,0000	0,0000
hsa-miR-338-5p	260,70	-1,82	0,16	-11,24	0,0000	0,0000
hsa-miR-542-3p	74,97	-1,90	0,20	-9,30	0,0000	0,0000
hsa-miR-511-5p	486,95	-1,92	0,24	-7,96	0,0000	0,0000
hsa-miR-30a-5p	2719,20	-1,96	0,23	-8,66	0,0000	0,0000
hsa-miR-500a-3p	94,58	-2,07	0,21	-9,94	0,0000	0,0000
hsa-miR-95-3p	93,17	-2,15	0,26	-8,29	0,0000	0,0000
hsa-miR-193a-5p	1371,81	-2,55	0,20	-12,93	0,0000	0,0000
hsa-miR-452-5p	77,90	-2,64	0,26	-10,33	0,0000	0,0000
hsa-miR-885-5p	75,44	-2,93	0,38	-7,71	0,0000	0,0000
hsa-miR-1246	523,70	-3,14	0,31	-10,10	0,0000	0,0000

Tabelle 7. Die 78 signifikant regulierten miRNAs zwischen Patienten mit einem septischen Schock und gesunden Probanden (Volunteer). Die miRNAs sind anhand ihres Log2FoldChanges (log2FC) in absteigender Reihenfolge gelistet. Die in der Kohorte mit septischen Schock hochregulierten miRNAs mit einem positiven log2FC sind grau hinterlegt, während die runterregulierten miRNAs mit einem negativen log2FC weiß hinterlegt sind. Abk.: lfcSE: Standfehler des Log2FC, stat: Wald-Test Statistik, p-Wert: des Wald-Test, p- adj: Benjamini-Hochberg angepasster p-Wert.

Ergebnisse

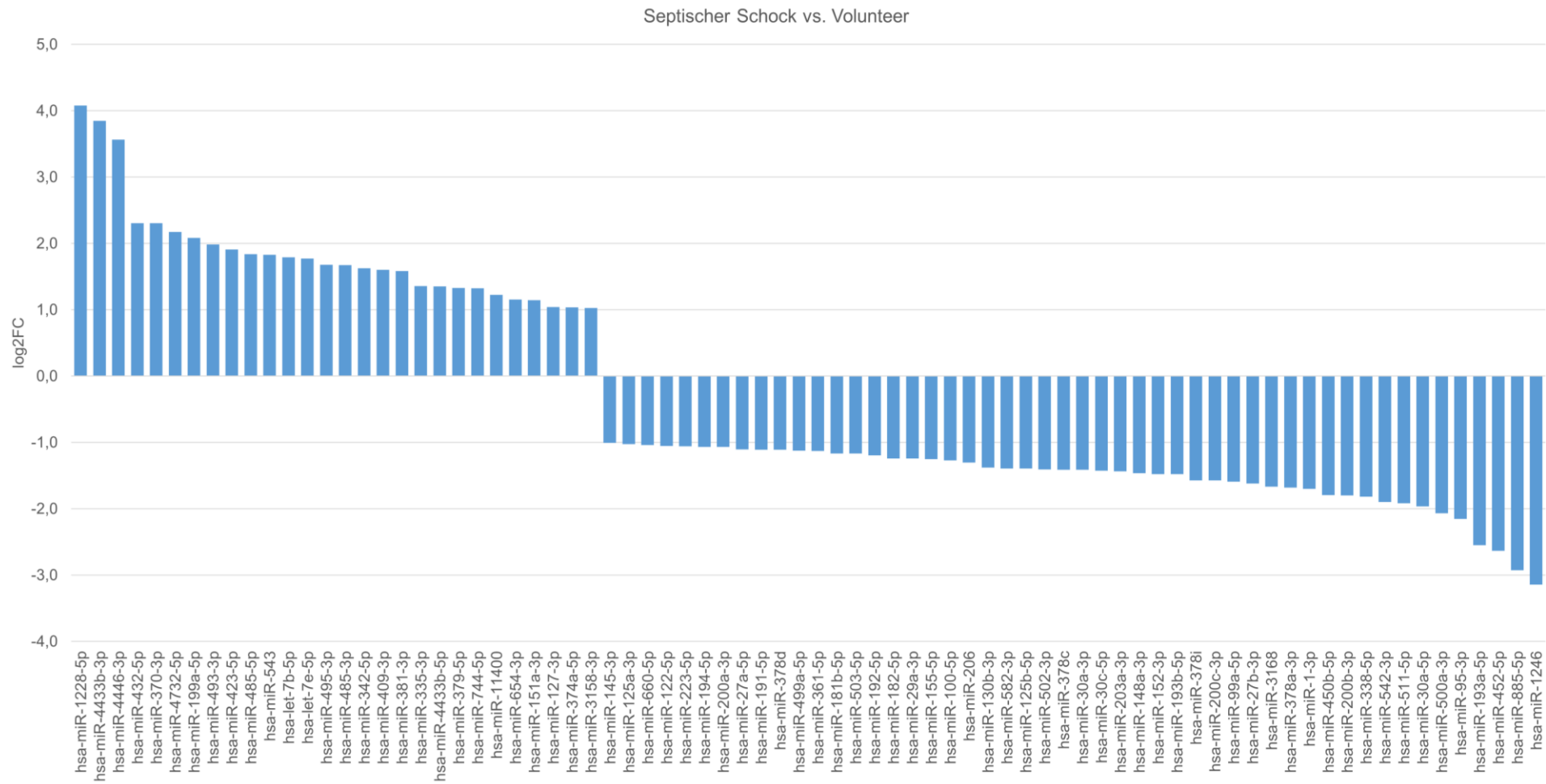


Abbildung 21. Log2FoldChange der signifikant veränderten miRNAs zwischen Patienten mit septischen Schock und gesunden Probanden (Volunteers).

Zu sehen ist der log2FoldChange (log2FC) der 78 signifikant veränderten exprimierten miRNAs der Sepsisgruppe mit septischen Schock gegenüber der Volunteerkohorte. Zur Interpretation: Die miRNA-1228-5p ist mit einem log2FC von 4,08 ($2^{4,08} = 16,91$) etwa siebzehn Mal so häufig in der Sepsisgruppe exprimiert wie in der Volunteergruppe. Die miR-1246 ist mit einem log2FC von -3,14 ($2^{-3,14} = 0,11$) etwa neunfach weniger exprimiert.

3.2.1.3 Volunteers vs. Pneumoniepatienten

Der Vergleich der miRNA-Expressionsprofile zwischen den Volunteers und Pneumoniepatienten brachte 29 signifikant regulierte miRNAs hervor (s. Tabelle 8 und Abbildung 22). Hierbei zeigten sich folgende fünf am höchsten hochregulierten miRNAs (log2FoldChange): miR-582-3p (2,53), miR-193a-5p (1,86), miR-542-3p (1,67), miR-885-5p (1,64) und miR-193b (1,50) und fünf (bzw. sechs) runterregulierte miRNAs (log2FoldChange): miR-432-5p (-1,65), miR-493-3p (-1,57), miR-654-5p (-1,55), miR-4732-5p (-1,32) und miR-127-3p (-1,26) sowie miR-199-5 (-1,26).

miRNA	baseMean	log2FC	p-Wert	p-adj
hsa-miR-582-3p	585,82	2,53	0,0000	0,0000
hsa-miR-193a-5p	1237,19	1,86	0,0000	0,0000
hsa-miR-542-3p	63,20	1,67	0,0000	0,0000
hsa-miR-885-5p	61,32	1,64	0,0043	0,0349
hsa-miR-193b-5p	81,48	1,50	0,0009	0,0122
hsa-miR-452-5p	57,00	1,37	0,0004	0,0076
hsa-miR-450b-5p	75,95	1,31	0,0000	0,0014
hsa-miR-27a-5p	82,11	1,29	0,0001	0,0028
hsa-miR-338-5p	212,18	1,28	0,0000	0,0002
hsa-miR-148a-3p	304143,06	1,18	0,0001	0,0034
hsa-miR-145-3p	412,67	1,17	0,0000	0,0002
hsa-miR-223-5p	5030,85	1,17	0,0000	0,0013
hsa-let-7b-3p	160,00	1,15	0,0000	0,0005
hsa-miR-27a-3p	14092,08	1,06	0,0000	0,0002
hsa-miR-1273h-3p	88,35	1,05	0,0000	0,0009
hsa-miR-320d	240,37	1,00	0,0036	0,0317
hsa-miR-543	946,40	-1,01	0,0035	0,0317
hsa-miR-335-3p	76,99	-1,08	0,0004	0,0076
hsa-miR-381-3p	390,63	-1,08	0,0033	0,0315
hsa-miR-379-5p	119,34	-1,12	0,0006	0,0095
hsa-let-7b-5p	27141,91	-1,15	0,0020	0,0218
hsa-miR-495-3p	91,14	-1,17	0,0005	0,0082
hsa-miR-215-5p	423,71	-1,23	0,0025	0,0265
hsa-miR-127-3p	122,90	-1,26	0,0000	0,0018
hsa-miR-199a-5p	337,95	-1,26	0,0000	0,0000
hsa-miR-4732-5p	148,06	-1,32	0,0002	0,0040
hsa-miR-654-5p	60,46	-1,55	0,0000	0,0016
hsa-miR-493-3p	101,12	-1,57	0,0002	0,0040
hsa-miR-432-5p	424,81	-1,65	0,0001	0,0021

Tabelle 8. Die 29 signifikant regulierten miRNAs zwischen Volunteers und ambulant erworbener Pneumonie. Die miRNAs sind anhand ihres Log2FoldChanges (log2FC) in absteigender Reihenfolge gelistet. Die in der Volunteerkohorte hochregulierten miRNAs mit einem positiven log2FC sind grau hinterlegt, während die runterregulierten miRNAs mit einem negativen log2FC weiß hinterlegt sind. Abk.: p-Wert: des Wald-Test, p- adj: Benjamini-Hochberg angepasster p-Wert.

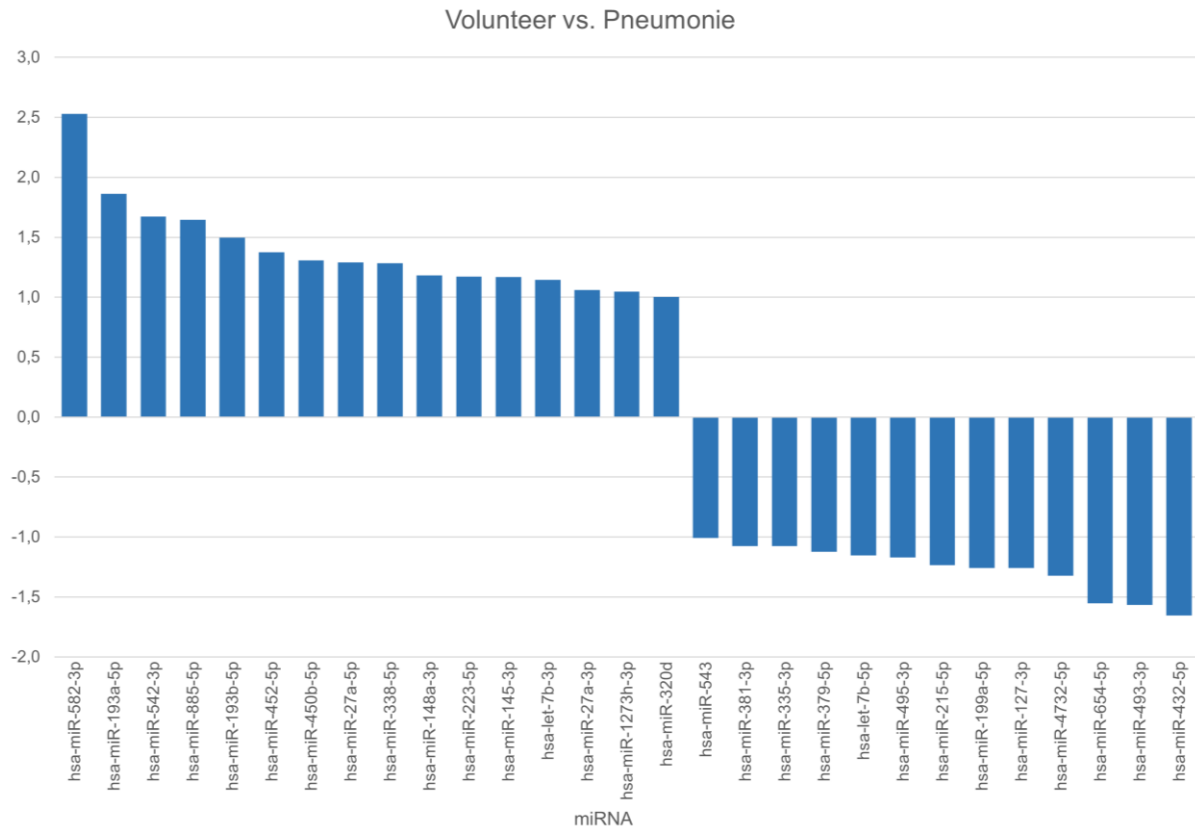


Abbildung 22. Log2Fold Change der signifikant veränderten miRNAs zwischen Volunteers und ambulant erworbener Pneumonie. Zu sehen ist der log2Fold Change (log2FC) der 29 signifikant veränderten exprimierten miRNAs der Volunteers gegenüber der Pneumoniegruppe. Zur Interpretation: Die miRNA-582-3p ist mit einem log2FC von 2,53 ($2^{2,53} = 5,78$) etwa sechs Mal häufiger in der Volunteergruppe exprimiert. Die miR-1246 ist mit einem log2FC von -1,65 ($2^{-1,65} = 0,32$) etwa dreifach weniger exprimiert.

3.2.1.4 Sepsis- vs. Pneumoniepatienten

In einem weiteren Schritt wurden die miRNA-Expressionsmuster der Patienten mit einer Sepsis mit denen einer ambulant erworbenen Pneumonie verglichen.

Die Analyse erbrachte 25 signifikant veränderte exprimierte miRNAs zwischen Sepsis- und Pneumoniepatienten (s. Tabelle 9 und Abbildung 23). Sie brachte folgende fünf am höchsten hochregulierte miRNAs (log2FoldChange): miR-1228-5p (4,70), miR-4433-3p (3,36), miR-4446-3p (2,05), miR-370-3p (1,28) und let-7e-5p (1,26) hervor. Folgende miRNAs (log2FoldChange) wurden am meisten runterreguliert: miR-1246 (-2,41), miR-95-3p (-2,13), miR-1-3p (-1,71), miR-500a-3p (-1,67) und miR-200c-3p (-1,66).

miRNA	baseMean	log2FC	p-Wert	p-adj
hsa-miR-1228-5p	79,86	4,70	0,0000	0,0001
hsa-miR-4433b-3p	402,55	3,36	0,0000	0,0000
hsa-miR-4446-3p	107,61	2,05	0,0000	0,0004
hsa-miR-370-3p	327,22	1,28	0,0006	0,0118
hsa-let-7e-5p	238,28	1,26	0,0001	0,0044
hsa-miR-11400	189,74	1,08	0,0004	0,0087
hsa-miR-150-3p	70,16	1,04	0,0017	0,0267
hsa-miR-378a-3p	2574,52	-1,03	0,0001	0,0041
hsa-miR-378c	67,89	-1,09	0,0004	0,0086
hsa-miR-93-5p	620,40	-1,10	0,0001	0,0031
hsa-miR-92a-3p	40541,23	-1,11	0,0007	0,0130
hsa-miR-378i	111,31	-1,12	0,0003	0,0076
hsa-miR-660-5p	54,08	-1,13	0,0007	0,0129
hsa-miR-501-3p	437,95	-1,17	0,0000	0,0002
hsa-miR-342-3p	58,31	-1,22	0,0033	0,0378
hsa-miR-18a-3p	86,31	-1,30	0,0020	0,0273
hsa-miR-192-5p	5623,89	-1,32	0,0008	0,0153
hsa-miR-511-5p	478,87	-1,54	0,0000	0,0015
hsa-miR-182-5p	1348,23	-1,58	0,0000	0,0008
hsa-miR-200b-3p	52,43	-1,60	0,0001	0,0028
hsa-miR-200c-3p	79,53	-1,66	0,0001	0,0028
hsa-miR-500a-3p	76,65	-1,67	0,0000	0,0002
hsa-miR-1-3p	1044,60	-1,71	0,0008	0,0143
hsa-miR-95-3p	80,54	-2,13	0,0000	0,0002
hsa-miR-1246	510,98	-2,41	0,0000	0,0002

Tabelle 9. Die 25 signifikant regulierten miRNAs zwischen Sepsis und ambulant erworbener Pneumonie. Die miRNAs sind anhand ihres Log2FoldChanges (log2FC) in absteigender Reihenfolge gelistet. Die in der Sepsiskohorte hochregulierten miRNAs mit einem positiven log2FC sind grau hinterlegt, während die runterregulierten miRNAs mit einem negativen log2FC weiß hinterlegt sind. Abk.: p-Wert: des Wald-Test, p- adj: Benjamini-Hochberg angepasster p-Wert.

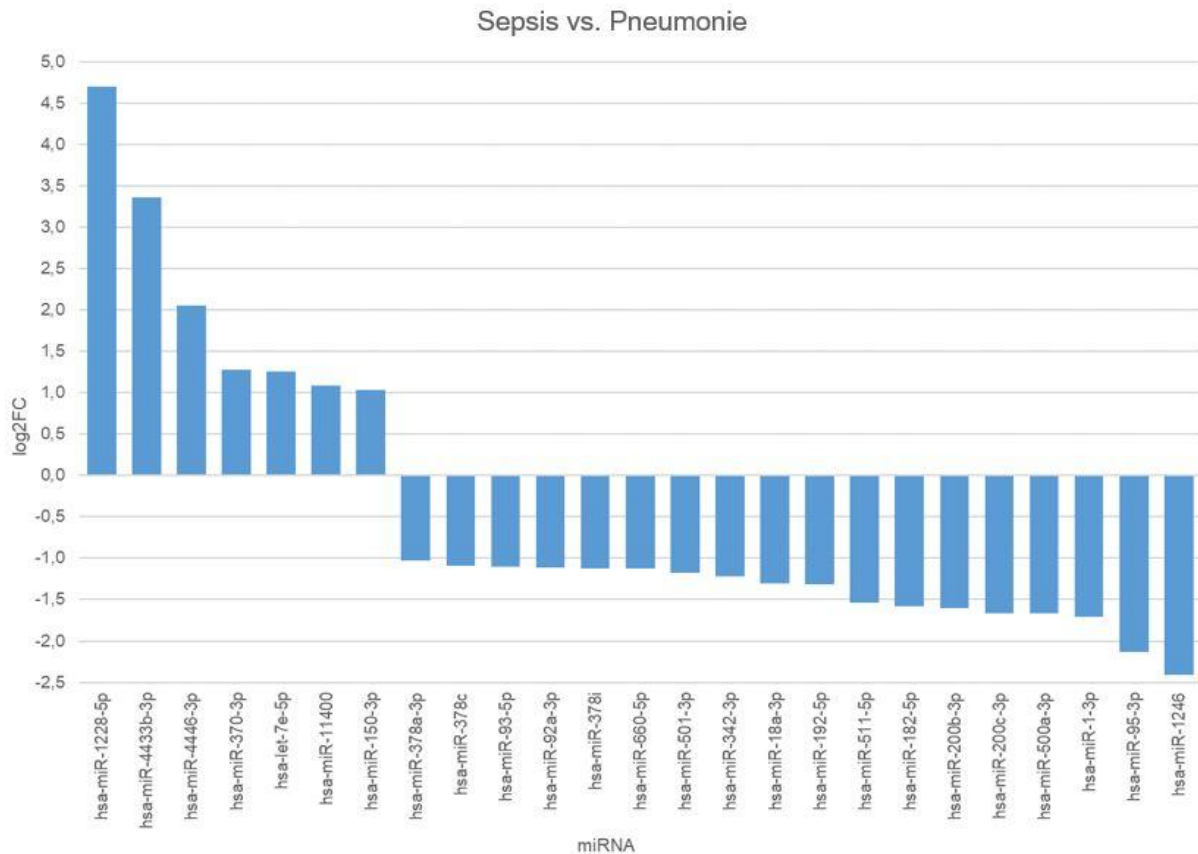


Abbildung 23. Log2 Fold Change der signifikant veränderten miRNAs zwischen Sepsis und Pneumonie. Zu sehen ist der log2FoldChange (log2FC) der 25 signifikant veränderten exprimierten miRNAs der Sepsiskohorte gegenüber der Pneumoniegruppe. In der Sepsiskohorte waren die miRNAs miR-1228-5p und -4433b-3p gegenüber der Pneumoniegruppe am meisten hochreguliert und die miR-1246 und -95-3p am meisten runterreguliert.

Bei der Untergruppe der Patienten mit einem septischen Schock konnten 26 miRNAs identifiziert werden, darunter 8 hoch- und 18 runterregulierte miRNAs (s. Tabelle 10 und Abbildung 24). Hier wird ersichtlich, dass die fünf am höchsten exprimierten miRNAs in der Gruppe mit septischen Schock sowohl im Vergleich mit gesunden Probanden als auch mit Pneumoniepatienten, die gleichen sind (miR-1228-5p, -4433b-3p, -4446-3p, -432-5p und -370-3p). Ebenso werden die miRNAs miR-1246 und miR-95-3p bei Patienten mit septischen Schock im Vergleich zu Pneumoniepatienten und Volunteers runterreguliert.

miRNA	baseMean	log2FC	lfcSE	stat	pvalue	padj
hsa-miR-1228-5p	59,06	5,01	0,75	6,66	0,0000	0,0000
hsa-miR-4433b-3p	288,49	3,77	0,53	7,09	0,0000	0,0000
hsa-miR-4446-3p	76,67	2,36	0,40	5,85	0,0000	0,0000
hsa-miR-423-5p	24114,11	1,44	0,30	4,80	0,0000	0,0002
hsa-miR-370-3p	265,74	1,44	0,33	4,33	0,0000	0,0008
hsa-miR-4433b-5p	104,60	1,28	0,42	3,04	0,0024	0,0290
hsa-miR-150-3p	60,53	1,19	0,27	4,40	0,0000	0,0007
hsa-let-7e-5p	195,68	1,14	0,31	3,71	0,0002	0,0061
hsa-miR-660-5p	59,21	-1,01	0,27	-3,80	0,0001	0,0047
hsa-miR-30a-5p	2719,20	-1,02	0,31	-3,24	0,0012	0,0192
hsa-miR-93-5p	690,47	-1,02	0,24	-4,32	0,0000	0,0008
hsa-miR-203a-3p	123,51	-1,07	0,38	-2,85	0,0043	0,0410
hsa-miR-192-5p	6252,24	-1,07	0,35	-3,11	0,0018	0,0238
hsa-miR-511-5p	486,95	-1,10	0,33	-3,30	0,0010	0,0173
hsa-miR-18a-3p	96,81	-1,11	0,39	-2,81	0,0050	0,0465
hsa-miR-152-3p	536,96	-1,11	0,35	-3,18	0,0015	0,0212
hsa-miR-215-5p	553,50	-1,23	0,44	-2,80	0,0051	0,0467
hsa-miR-452-5p	77,90	-1,23	0,35	-3,48	0,0005	0,0112
hsa-miR-182-5p	1375,18	-1,25	0,31	-4,00	0,0001	0,0026
hsa-miR-1-3p	1124,13	-1,56	0,45	-3,44	0,0006	0,0119
hsa-miR-200c-3p	93,90	-1,59	0,37	-4,31	0,0000	0,0008
hsa-miR-500a-3p	94,58	-1,60	0,30	-5,42	0,0000	0,0000
hsa-miR-200b-3p	71,49	-1,62	0,34	-4,69	0,0000	0,0002
hsa-miR-1299	53,84	-1,70	0,59	-2,87	0,0041	0,0398
hsa-miR-95-3p	93,17	-1,88	0,37	-5,12	0,0000	0,0000
hsa-miR-1246	523,70	-2,10	0,43	-4,85	0,0000	0,0001

Tabelle 10. Die 26 signifikant regulierten miRNAs zwischen Patienten mit einem septischen Schock und Pneumoniepatienten. Die miRNAs sind anhand ihres Log2FoldChanges (log2FC) in absteigender Reihenfolge gelistet. Die in der Kohorte mit septischen Schock hochregulierten miRNAs mit einem positiven log2FC sind grau hinterlegt, während die runterregulierten miRNAs mit einem negativen log2FC weiß hinterlegt sind. Abk.: lfcSE: Standfehler des Log2FC, stat: Wald-Test Statistik, p-Wert: des Wald-Test, p- adj: Benjamini-Hochberg angepasster p-Wert.

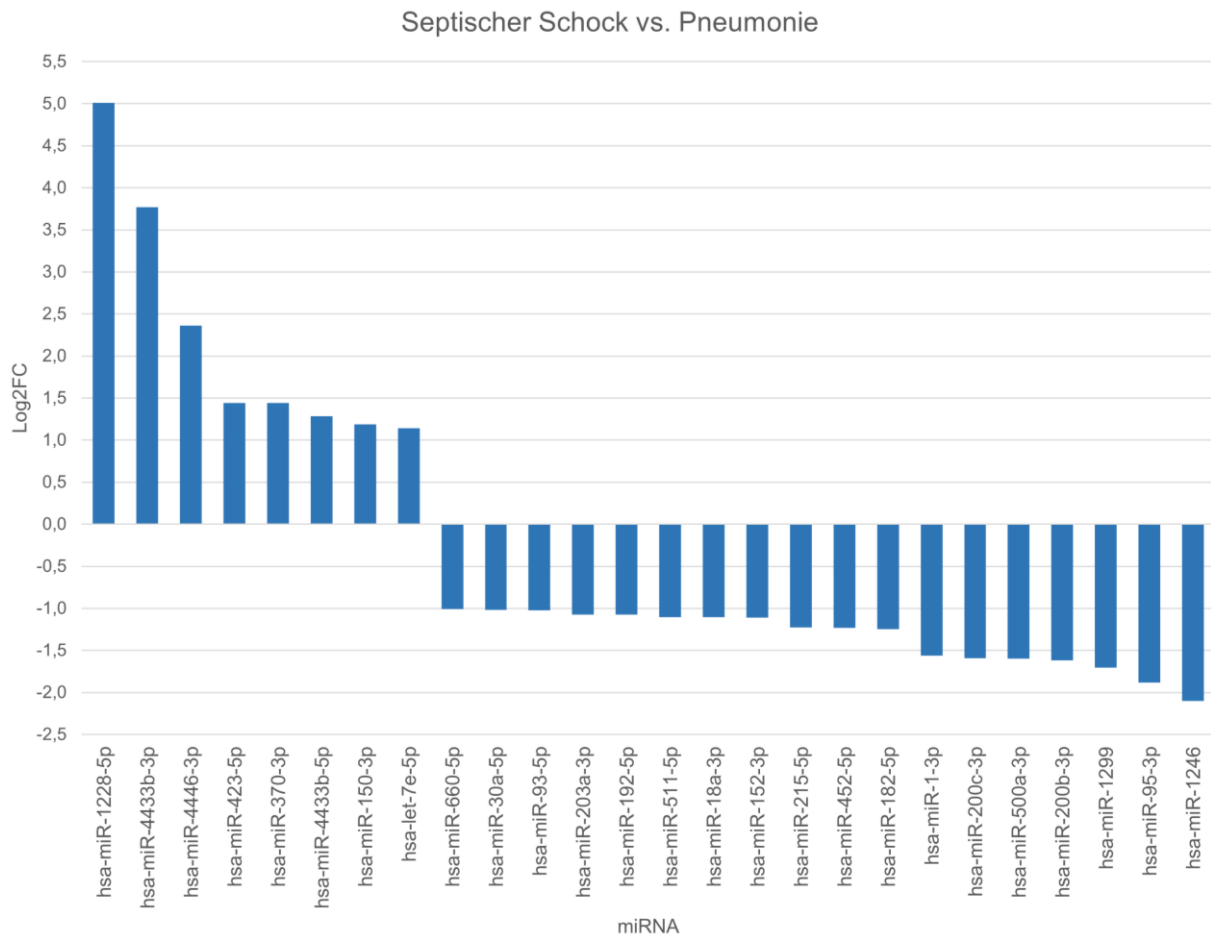


Abbildung 24. Log2FoldChange der signifikant veränderten miRNAs zwischen Patienten mit septischen Schock und Pneumoniepatienten. Zu sehen ist der log2FoldChange (log2FC) der 26 signifikant veränderten exprimierten miRNAs der Sepsisgruppe mit septischen Schock gegenüber der Pneumoniekoorte. Zur Interpretation: Die miRNA-1228-5p ist mit einem log2FC von 5,01 ($2^{5,01}=32,22$) etwa zweiunddreißig Mal so häufig in der Gruppe mit septischen Schock exprimiert wie in der Pneumoniegruppe. Die miR-1246 ist mit einem log2FC von -2,10 ($2^{-2,10} = 0,23$) etwa vier Mal weniger exprimiert.

3.2.2 Statistische Auswertung der miRNAs

Nachdem die signifikant regulierten miRNAs aus den Kohorten identifiziert wurden, konnte im nächsten Schritt die Korrelation zwischen ihren Expressionswerten (normalisierte *read counts*) mit klinischen Variablen untersucht werden. Die Ergebnisse werden als Spearman-Korrelationskoeffizient (r_s) und Signifikanzniveau ($p \leq 0,05$) angegeben. Hierbei wird die Korrelation (positiv oder negativ) in gar nicht bis gering ($r_s \leq 0,2$), schwach bis mäßig ($0,2 < r_s \leq 0,5$), deutlich/stark ($0,5 < r_s \leq 0,8$) und hoch/sehr stark ($0,8 < r_s \leq 1,0$) eingeteilt. In einem weiteren Schritt wurden diese Korrelationen mittels Regressionsanalyse überprüft. Je nach Kategorie der untersuchten Variable, wurde eine multiple lineare, binär logistische, multinominal logistisch oder ordinale Regressionsanalyse durchgeführt. Korrelierten mehrere miRNAs mit einem klinischen Parameter, wurde eine multiple Regressionsanalyse angewandt. Hierbei wurde zunächst mittels der schrittweisen Einschlussmethode der Einfluss mehrerer miRNAs zueinander und gegenüber dem untersuchten Parameter überprüft und im Anschluss dieses Ergebnis mittels der Vorwärts- und Rückwärtsmethode (Ausschluss bei $p > 0,05$) bestätigt. Die Ergebnisse werden in den entsprechenden Tabellen u.a. mit dem Regressionskoeffizienten, dem Signifikanzniveau und dem 95% Konfidenzintervall (95% KI) angegeben. Zur Evaluierung der miRNAs als Biomarker wurde die ROC (*engl.* receiver operating characteristic) Analyse gerechnet. Ergebnisse werden als ROC-Kurve, AUC (*engl.* area under the curve), Signifikanzniveau ($p \leq 0,05$) sowie 95% Konfidenzintervall (95% KI) angegeben.

3.2.2.1 miRNAs und Pneumonie

Für die Analyse wurden die signifikant veränderten miRNAs aus den Vergleichen zwischen der Volunteer- vs. Pneumoniegruppe (s. Tabelle 5 und Abbildung 19), sowie Pneumonie vs. Volunteer (s. Tabelle 8 und Abbildung 22) gewählt. Eine Übersicht zeigt Tabelle 11.

miRNA	Bei gesunden Probanden (Volunteer)	Bei Pneumonie
hsa-let-7b-3p	↑	↓
hsa-let-7b-5p	↓	↑
hsa-miR-27a-3p	↑	↓
hsa-miR-27a-5p	↑	↓
hsa-miR-127-3p	↓	↑
hsa-miR-145-3p	↑	↓
hsa-miR-148a-3p	↑	↓
hsa-miR-193b-5p	↑	↓
hsa-miR-193a-5p	↑	↓
hsa-miR-199a-5p	↓	↑
hsa-miR-215-5p	↓	-
hsa-miR-223-5p	↑	↓
hsa-320d	↑	-
hsa-miR-335-3p	↓	↑
hsa-miR-338-5p	↑	↓
hsa-miR-381-3p	↓	↑
hsa-miR-379-5p	↓	↑
hsa-miR-432-5p	↓	↑
hsa-miR-450a-5p	-	↓
hsa-miR-450b-5p	↑	↓
hsa-miR-452-5p	↑	↓
hsa-miR-493-3p	↓	↑
hsa-miR-495-3p	↓	↑
hsa-miR-543	↓	↑
hsa-miR-542-3p	↑	↓
hsa-miR-582-3p	↑	↓
hsa-miR-654-5p	↓	-
hsa-miR-885-5p	↑	↓
hsa-1273h-3p	↑	-
hsa-miR-4446-3p	-	↑
hsa-miR-4732-5p	↓	↑

Tabelle 11. Signifikant veränderte miRNAs bei Volunteer vs. Pneumonie und Pneumonie vs. Volunteer. In der Tabelle sind alle signifikant veränderten miRNAs nach Name aufgelistet. Solche die nur in einer Vergleichsuntersuchung signifikant verändert waren (z.B. miR-215-5p), sind nur in der untersuchten Gruppe mit der Veränderung gelistet. Die in beiden Untersuchungen bei Pneumoniepatienten hochregulierten miRNAs sind grau hinterlegt. Abk.: ↓: in der Gruppe weniger exprimiert, ↑: in der Gruppe vermehrt exprimiert, -: in der Gruppe nicht signifikant verändert (z.B. wurde die miR-215-5p bei der Untersuchung Volunteer vs. Pneumonie in der Pneumoniegruppe nicht signifikant verändert, bei Untersuchung Pneumonie vs. Volunteer jedoch in der Volunteergruppe weniger exprimiert).

Pneumonie vs. Volunteer

In der Gruppe Pneumonie vs. Volunteer wurden die miRNAs mit dem Curb-65 Score und Dauer des Klinikaufenthaltes, sowie zusätzlich mit laborchemischen Parametern wie der Leukozytenzahl, CRP, Procalcitonin und IL - 6 verglichen. Aus Tabelle 12 können die ausführlichen Ergebnisse entnommen werden. Bezüglich der Entzündungsparameter konnten, abgesehen vom CRP, für jede Variable eine Korrelation mit mindestens einer miRNA identifiziert werden. Viele miRNAs zeigten jedoch gar keine Korrelation und sind deshalb in der Tabelle nicht aufgeführt.

Der CURB-65-Score korrelierte positiv mit der vermehrt exprimierten miR-127-3p ($r_s = 0,587$, $p = 0,045$) und der weniger exprimierten miR-193b-5p ($r_s = 0,667$, $p = 0,018$), sowie negativ mit der vermehrt exprimierten miR-215-5p ($r_s = -0,613$, $p = 0,034$). Die Dauer des Klinikaufenthaltes korrelierte positiv mit der in der Pneumoniegruppe weniger exprimierten miR-193a-5p ($r_s = 0,789$, $p = 0,002$).

Die Leukozytenzahl korrelierte signifikant mit drei miRNAs (miR-127-3p, miR-379-5p und miR-450b-5p) und das PCT und IL – 6 jeweils mit einer miRNA (miR-543 bzw. miR-4732-5p) (s. Tabelle 12).

Das Hämoglobin (Hb) ist ein Protein der Erythrozyten, das dem Sauerstofftransport dient. Bei Patienten mit schwerwiegenden Erkrankungen, wie beispielsweise Sepsis oder septischen Schock, ist ein Abfall bzw. ein initial niedriger Hb-Wert mit einem schlechteren Outcome assoziiert.^{77–79} Wir haben deshalb den Hb bereits bei Patienten mit Pneumonie untersucht. Der Hb-Wert korrelierte stark negativ mit vier miRNAs: miR-27a-3p ($r_s = -0,664$, $p = 0,018$), miR-145-3p ($r_s = -0,636$, $p = 0,026$), miR-148a-3p ($r_s = -0,664$, $p = 0,018$) und miR-582-3p ($r_s = -0,601$, $p = 0,039$). Zur Beurteilung der Korrelation zwischen miRNAs und der Gerinnung haben wir uns folgende Parameter angeschaut: Thrombozyten (als Parameter für die primäre Gerinnungskaskade), partielle Thromboplastinzeit (PTT) (als Parameter für die sekundäre intrinsische Gerinnungskaskade) und Quick bzw. INR (als Parameter für die sekundäre extrinsische Gerinnungskaskade). Die für die primäre Blutgerinnung wichtigen Thrombozyten korrelierten lediglich mit der miR-27a-3p ($r_s = 0,616$, $p = 0,033$). Es konnten keine Korrelationen zwischen miRNAs und dem Quick bzw. INR nachgewiesen werden, es zeigte sich jedoch eine starke positive Korrelation zwischen der PTT und der miR-450b-5p ($r_s = 0,631$, $p = 0,037$) sowie der miR-582-3p ($r_s = 0,627$, $p = 0,039$).

Ergebnisse

miRNA	CURB-65 Score	Dauer Klinikaufenthalt	Leukozyten Tag 0	PCT Tag 0	IL- 6 Tag 0	Hämoglobin Tag 0	Thrombozyten Tag 0	aPTT Tag 0	Harnstoff Tag 0
miR-27a-3p	-	-	-	-	-	-0,664 (0,018)	0,616 (0,033)	-	-
miR-127-3p	0,587 (0,045)	-	-0,671 (0,017)	-	-	-	-	-	-
miR-145-3p	-	-	-	-	-	-0,636 (0,026)	-	-	-
miR-148a-3p	-	-	-	-	-	-0,664 (0,018)	-	-	-
miR-193a-5p	-	0,789 (0,002)	-	-	-	-	-	-	-
miR-193b-5p	0,667 (0,018)	-	-	-	-	-	-	-	-
miR-215-5p	-0,613 (0,034)	-	-	-	-	-	-	-	-
miR-320d	-	-	-	-	-	-	-	-	0,669 (0,049)
miR-379-5p	-	-	-0,636 (0,026)	-	-	-	-	-	-
miR-450b-5p	-	-	0,706 (0,010)	-	-	-	-	0,631 (0,037)	-
miR-543	-	-	-	-0,632 (0,050)	-	-	-	-	-
miR-582-3p	-	-	-	-	-	-0,601 (0,039)	-	0,627 (0,039)	-
miR-4732-5p	-	-	-	-	0,757 (0,049)	-	-	-	-

Tabelle 12. Korrelation signifikanter miRNAs (Pneumonie vs. Volunteers) mit klinischen Parametern der Pneumoniegruppe. Daten sind angegeben als Spearmans Korrelationskoeffizient und (p-Wert), hochregulierte miRNAs sind grau hinterlegt. Die miR-215-5p und miR-320d ist nur in der Pneumonie vs. Volunteer-Untersuchung bei der Volunteergruppe weniger bzw. mehr exprimiert worden. Für unsere Berechnungen ist davon ausgegangen, dass sie in der Pneumoniegruppe dementsprechend mehr bzw. weniger exprimiert worden ist. Zu sehen ist die Korrelation zwischen demografischen Variablen sowie Laborparameter und Expressionswerten (normalisierte read counts) signifikanter regulierter miRNAs, wobei gesunde Freiwillige und Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie verglichen werden. Dabei erfolgte die Auswertung mit allen miRNAs, die in Tabelle 5 und Tabelle 8 aufgeführt sind. Die hier angegebenen miRNAs sind nur diejenigen, bei der eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden konnte. Es konnte keine Korrelation zwischen miRNAs und dem C-reaktiven Protein, Quick, INR, Kreatinin und der Dauer der Antibiotikatherapie nachgewiesen werden, weswegen sie in der Tabelle nicht aufgeführt sind. Abk.: BMI: Body-Mass-Index, PCT: Procalcitonin, PTT: aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Zur Beurteilung der Nierenfunktion wurden Korrelationen zwischen dem Kreatinin-Wert und dem Harnstoff-Wert an Tag 0 überprüft. Hierbei zeigte sich keine Korrelation mit dem Kreatinin-Wert. Der Harnstoff korreliert mit der miR-320d stark positiv ($r_s=0,669$, $p=0,049$).

Regressionsanalyse bei Pneumonie

Bei der Interpretation von Ergebnissen, vor allem in Hinblick auf Korrelationen, ist es wichtig mögliche Zusammenhänge mithilfe der Regressionsanalyse zu untersuchen (s. Tabelle 13).

Bei Parametern mit Korrelationen zu mehreren miRNAs wurde eine multiple (lineare) Regressionsanalyse gerechnet. Zuerst wurde mittels schrittweisen Einschlusses der miRNAs ein Zusammenhang zwischen dem Parameter und den einzelnen miRNAs, sowie in einem weiteren Schritt der Einfluss mehrerer miRNAs, untersucht.

Die vorher nachgewiesenen Korrelationen ergaben bei der Regressionsanalyse nicht bei allen ein signifikantes Ergebnis. So konnte zwischen den Expressionsniveaus der miRNAs miR-193b-5p, miR-215-5p sowie miR-127-3p und der Höhe des CURB-65 Scores keine signifikante Regressionsanalyse aufgezeigt werden.

Die starke Korrelation der miR-193a-5p mit der Dauer des Klinikaufenthaltes ($r_s = 0,789$, $p = 0,002$), konnte in der Regressionsanalyse bestätigt werden. Demnach konnten knapp 85% (korrigiertes $R^2 = 0,849$) der Dauer durch das Expressionsniveau der miRNA beschrieben werden. Je höher die miR-193a-5p exprimiert wird, desto wahrscheinlicher ist es, dass der Patient mehr Tage in der Klinik verbleibt (positive Korrelation und positiver Regressionskoeffizient B).

Die miR-127-3p, welche mit einem log2FC von 1,07 bei der Pneumoniekohorte hochreguliert wird bzw. bei gesunden Probanden mit einem log2FC von -1,26 weniger exprimiert wird, korreliert negativ mit der Leukozytenzahl ($r_s = -0,671$, $p = 0,017$). Sie ist die einzige miRNA der vorher korrelierenden miRNAs welche signifikant ($p = 0,028$) etwa 33,9% der Leukozytenwerte vorhersagen kann (korrigiertes $R^2 = 0,339$). Je höher die miR-127-3p exprimiert wird, desto niedriger ist die Leukozytenzahl. Das bedeutet, dass die bei Pneumoniepatienten mehr exprimierte miR-127-3p eher mit einer niedrigen Leukozytenzahl einhergehen kann.

Die Auswertungen des PCT und der miR-543, sowie des IL-6 und der miR-4732-5p ergab keine signifikanten Ergebnisse.

Bei der Analyse des Hämoglobins und der korrelierenden miRNAs (miR-27a-3p, miR-145-3p, miR-148a-3p und miR-582-3p) konnte nur für die miR-145-3p eine signifikante Regressionsanalyse errechnet werden. Diese zeigte jedoch eine geringe Aussagekraft bei einem korrigierten R^2 von nur 0,299.

Die Parameter Thrombozytenzahl und pTT mit ihren korrelierenden miRNAs ergab keine signifikante Regressionsanalyse.

Die Höhe des Harnstoffes korrelierte stark positiv ($r_s = 0,669$, $p = 0,049$) mit dem Expressionsniveau der im Vergleich zur Volunteergruppe hochregulierten miR-320d (log2FC 1,0). Zur Interpretation: je höher die miR-320d bei Pneumoniepatienten exprimiert wird, desto eher steigt auch der Harnstoff-Wert (u.a. gegebenenfalls als Zeichen einer eingeschränkten Nierenfunktion).⁸⁰ Dieser Zusammenhang konnte auch in der Regressionsanalyse bestätigt werden: korrigiertes R^2 von 0,717, $p = 0,002$.

Ergebnisse

Pneumonie vs. Volunteers												
Parameter	miRNAs	R	R ²	Korrigiertes R ²	Standardfehler des Schätzers	F	p-Wert von F	Regressionskoeffizient B	Standardisierter Regressionskoeffizient B	T	p-Wert von T	95% KI
CURB-65 Score _a	miR-193b-5	Keine signifikanten Ergebnisse										
	miR-215-5p											
	miR-127-3p											
Dauer Klinikaufenthalt	miR-193a-5p	0,929	0,862	0,849	3,518	62,710	0,000	0,010	0,929	7,919	0,000	0,007 – 0,013
Leukozyten an Tag 0	miR-450b-5p	Ausschluss aus der Analyse, weil keinen signifikanten Einfluss										
	miR-379-5p											
	miR-127-3p	0,632	0,399	0,339	3,87297	6,637	0,028	-0,083	-0,632	-2,576	0,028	-0,155 - -0,011
PCT an Tag 0	miR-543	Keine signifikanten Ergebnisse										
IL-6 an Tag 0	miR-4732-5p	Keine signifikanten Ergebnisse										
Hämoglobin an Tag 0	miR-27a-3p	Ausschluss aus der Analyse, weil keinen signifikanten Einfluss										
	miR-145-3p	0,602	0,362	0,299	2,0816	5,681	0,038	-0,006	-0,602	-2,383	0,038	-0,012 – 0,000
	miR-148a-3p	Ausschluss aus der Analyse, weil keinen signifikanten Einfluss										
	miR-582-3p											

Tabelle 13. Fortsetzung nächste Seite

Pneumonie vs. Volunteers												
Parameter	miRNAs	R	R ²	Korrigiertes R ²	Standardfehler des Schätzers	F	p-Wert von F	Regressionskoeffizient B	Standardisierter Regressionskoeffizient B	T	p-Wert von T	95% KI
Thrombozyten an Tag 0	miR-27a-3p	Keine signifikanten Ergebnisse										
aPTT an Tag 0	miR-582-3p	Keine signifikanten Ergebnisse										
	miR-450-5p											
Harnstoff an Tag 0	miR-320d	0,876	0,752	0,717	31,770	21,221	0,002	0,113	0,867	4,607	0,002	0,055 – 0,171

Tabelle 13. Regressionsanalyse der miRNAs und der klinischen Parameter der Pneumoniepatienten. Hochregulierte miRNAs sind grau hinterlegt.

Es wurde entsprechend dem Skalenniveau die passende Regressionsanalyse ausgewählt, welche einen kausalen Zusammenhang zwischen einer abhängigen (z.B. Dauer des Klinikaufenthaltes oder die Höhe der Leukozyten) und einer unabhängigen Variable (miRNA) beschreiben kann. Bei der multiplen linearen Regressionsanalyse wurde zunächst eine schrittweise Einschlussanalyse und zur Bestätigung die Rückwärts-Ausschlussmethode gewählt. ^a ordinale Regressionsanalyse. Abk.: F: F-Test; KI: Konfidenzintervall. Erklärung: R: Der Korrelationskoeffizient R gibt die Höhe eines Zusammenhangs der Variablen an. Je näher dieser Wert an 1 ist, desto stärker der Zusammenhang. R²: Der Determinationskoeffizient R² beschreibt wie sehr die Varianz der abhängigen Variable (z.B. CURB-65-Score) durch die miRNA erklärt wird. Je näher der Wert an 1 ist, desto eher ist die Varianz zu erklären. Mit einer erhöhten Anzahl an Daten steigt automatisch der R²-Wert, weswegen der korrigierte R²-Wert den eigentlichen interpretierbaren Wert darstellt. Die Angabe des korrigierten R²-Wertes kann angeben, wie viel Prozent der abhängigen Variable von der unabhängigen Variable vorhergesagt werden kann. F-Test: Dieser überprüft die Signifikanz des Modells. Liegt der p-Wert Wert < 0,05 ist von signifikanten Variablen im Regressionsmodell auszugehen. Regressionskoeffizient B: der nicht standardisierte Regressionskoeffizient B beschreibt die Richtung und das Ausmaß der Veränderung durch die miRNA. Standardisierter Regressionskoeffizient B: Vergleich der Auswirkung zwischen den einzelnen miRNAs. Je höher der Betrag (unabhängig vom Vorzeichen), desto größer der Einfluss. t-Test (T) und Signifikanz Sig.: beschreibt, ob der Regressionskoeffizient signifikant ist (bei p<0,05).

ROC und AUC der Pneumoniepatienten

Wir haben untersucht, ob das miRNA-Expressionsmuster einen verlängerten Klinikaufenthalt vorhersagen kann. Dieser ist nicht nur mit höheren Kosten, sondern ebenfalls mit einem schlechteren klinischen Outcome verbunden. Die durchschnittliche Behandlungsdauer einer bakteriell ambulant erworbenen Pneumonie liegt zwischen sieben und zehn Tagen⁸¹ bzw. bei 9,8 Tagen.⁸² Deswegen haben wir die Patienten untersucht die länger als sieben bzw. zehn Tage in der Klinik behandelt worden sind und das Expressionsniveau der runterregulierten miR-193a-5p. Die Analysen ergaben aufgrund der Datengröße keine aufschlussreichen Ergebnisse. Bei einem Cut-Off von 7 Tagen wurden von den 12 Patienten drei (25%) ≤ 7 Tage und neun (75%) > 7 Tage stationär behandelt. Die ROC-Analyse ergab für die miRNA miR-193a-5p zwar eine sehr gute AUC von 1,000 mit einem p-Wert=0,013, aber bei einem 95%-Konfidenzintervall von 1,0-1,0 und einer Patientenanzahl von neun, ist dieses Ergebnis nicht verwertbar. Gleiches gilt für den Cut-Off von 10 Tagen, bei dem von den 12 Pneumoniepatienten sechs (50%) < 10 Tagen und sechs (50%) ≥ 10 Tagen stationär behandelt wurden. Hierbei ergab die Auswertung eine AUC von 0,889, einen p-Wert von 0,025 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,697-1,0.

3.2.2.2 miRNAs und Sepsis

Sepsis vs. Pneumonie

Die signifikant regulierten miRNAs in der Sepsis bzw. septischer Schock vs. Pneumoniegruppe (s. Tabelle 9 und Tabelle 10), wurden auf Korrelationen mit demografischen Daten (BMI), klinischen Scores (SOFA, APACHE II, SAPS II und MODS) sowie Behandlungsvariablen (Dauer der intensivmedizinischen Versorgung, Dauer des gesamten Klinikaufenthaltes und Dauer der mechanischen (invasiven und nicht-invasiven) Beatmung untersucht (s. Tabelle 14).

Für die Variable des Body-Mass-Index, konnte keine Korrelation mit einer miRNA gefunden werden.

Die an Tag 0 erhobenen Scores (SOFA, APACHE II, SAPS II und MODS) wurden ebenfalls mit den miRNAs korreliert. Hierbei zeigte sich keine Korrelation für den SOFA-Score und den MODS mit den miRNAs. Für den APACHE II Score konnte eine mäßige positive Korrelation mit der hochregulierten miR-150-3p ($r_s = 0,390$, $p = 0,044$) nachgewiesen werden. Der SAPS II korrelierte mäßig negativ mit der mehr exprimierten miR-1228-5p ($r_s = -0,391$, $p = 0,040$). Das bedeutet je höher die miR-150-3p bei Sepsispatienten exprimiert wird, desto höher ist der APACHE II Score und je höher die miR-1228-5p, desto niedriger ist der SAPS II.

Für eine bessere Beurteilung der miRNAs als prognostische Werte für den Verlauf bzw. der Schwere einer Sepsis analysierten wir eine Kombination von Sepsis-Scores, die an Tag 0 des Studieneinschlusses erhoben worden sind. Hierfür untersuchten wir diejenigen Patienten, die gleichzeitig einen SOFA-Score ≥ 10 Punkten, einen APACHE II ≥ 20 und einen MODS ≥ 9 Punkten aufwiesen. Von den 28 Sepsispatienten erfüllten 12 diese Kriterien (von einem Patienten fehlten die vollständigen Angaben). Die vermehrt exprimierten miRNAs miR-150-3p ($\log_2FC=1,04$) und miR-4446-3p ($\log_2FC=2,05$) korrelierten mäßig stark mit der Höhe der Sepsis-Scores $r_s=0,450$ und $p=0,019$ bzw. $r_s=0,383$ und $p=0,049$. Die runterregulierte miR-192-5p ($\log_2FC=-1,32$) korrelierte mäßig negativ mit den Sepsis-Scores ($r_s=-0,383$, $p=0,049$). Demnach gilt für Sepsispatienten, bei denen die miR-192-5p gegenüber Pneumoniepatienten weniger exprimiert wird: je niedriger der Wert, desto höher die kombinierten Sepsis-Scores.

Die Behandlungsvariablen des Intensiv- und Klinikaufenthaltes, sowie die Dauer der Beatmung wurde ebenfalls untersucht. Hier fällt auf, dass die am stärksten hochregulierte miR-1228-5p ($\log_2FC = 4,7$) schwach positiv mit der Dauer des Klinikaufenthaltes korreliert ($r_s = 0,439$, $p = 0,022$) und die am stärksten runterregulierte miR-1246 schwach positiv mit der Dauer des ITS-Aufenthaltes korreliert ($r_s = 0,413$, $p = 0,032$). Die runterregulierte miR-93-5p wies eine schwache negative Korrelation mit allen drei Variablen auf: Dauer ITS-Aufenthalt ($r_s = -0,470$, $p = 0,013$), Dauer Klinikaufenthalt ($r_s = -0,437$, $p = 0,023$) und Dauer der

Beatmung ($r_s = -0,374$, $p = 0,050$). Das bedeutet, je höher die miR-93-5p bei einem Patienten exprimiert ist, desto kürzer ist der ITS- und Klinikaufenthalt, sowie die Anzahl der Beatmungstage.

miRNA	APACHE II-Score Tag 0	SAPS II Tag 0	Kombinierte Sepsis-Scores*	Dauer des ITS-Aufenthalts	Dauer des Klinik-aufenthalts	Dauer der Beatmung
miR-18a-3p	-	-	-	-	-	-0,400 (0,035)
miR-92a-3p	-	-	-	-0,502 (0,008)	-	-0,375 (0,049)
miR-93-5p	-	-	-	-0,470 (0,013)	-0,437 (0,023)	-0,374 (0,050)
miR-150-3p	0,390 (0,044)	-	0,450 (0,019)	0,499 (0,008)	-	-
miR-192-5p	-	-	-0,383 (0,049)	-	-	-
miR-342-3p	-	-	-	-	-0,383 (0,049)	-
miR-1228-5p	-	-0,391 (0,040)	-	-	0,439 (0,022)	-
miR-1246	-	-	-	0,413 (0,032)	-	-
miR-4446-3p			0,383 (0,049)			

Tabelle 14. Korrelationen zwischen miRNAs und klinischen Parametern der Sepsispatienten. Daten sind angegeben als Spearmans Korrelationskoeffizient und (p-Wert), hochregulierte miRNAs sind grau hinterlegt. Zu sehen ist die Korrelation zwischen Scores, demografischen und Behandlungsvariablen und Expressionswerten signifikant regulierter miRNAs, wobei Patienten mit Sepsis und Pneumonie verglichen werden. Dabei erfolgte die Auswertung mit allen miRNAs, die in Tabelle 9 aufgeführt werden. Die hier angegebenen miRNAs sind nur diejenigen, bei denen eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich z. B. keine Korrelation zwischen miRNAs und dem BMI, SOFA-Score und MODS. *Kombinierte Sepsis-Scores: Patienten die gleichzeitig einen SOFA-Score ≥ 10 Punkten, einen APACHE II ≥ 20 und einen MODS ≥ 9 Punkten aufwiesen. Von den 28 Sepsispatienten erfüllten 12 diese Kriterien (von einem Patienten fehlten die vollständigen Angaben). Abk.: APACHE: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation, SAPS: Simplified Acute Physiology Score

Es wurde ebenso analysiert, ob es eine Korrelation zwischen den miRNA-Expressionsniveaus aller in Tabelle 9 aufgeführten miRNAs und dem Versterben der Patienten während der Studie gibt. Es zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Mortalität und der herabregulierten miR-93-5p (Eta-Korrelationskoeffizient = 0,403, $p = 0,034$) (s. Tabelle 15). Das bedeutet, dass es einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau der runterregulierten miRNA und dem Versterben der Patienten gibt.

Parameter	miRNA	Eta	Eta ²	Signifikanz
Versterben während Studie	miR-93-5p	0,403	0,162	0,034

Tabelle 15. Korrelation zwischen miR-93-5p und dem Versterben der Sepsispatienten während der Studie. Hier wurden die miRNAs in Bezug auf das Versterben während der Studie und den miRNAs korreliert. Dabei wurde die miRNA als abhängige Variable ausgewählt. Der Eta-Quadrat-Koeffizient (Eta²) beschreibt wie viel Prozent der gesamten miRNA Varianz durch das Versterben erklärt wird (es werden 16,2% durch die Ausprägung der miR-93-5p erklärt). Dabei erfolgte die Auswertung mit allen miRNAs die in Tabelle 9 aufgeführt werden und die hier angegebene miRNA ist die einzige, bei der eine signifikante Korrelation ($p \leq 0,05$) nachgewiesen werden konnte.

In einem weiteren Schritt wurde der Zusammenhang zwischen den Entzündungsparametern (Leukozyten, Procalcitonin, CRP und IL-6) sowie dem maximalen Laktat-Wert und dem Katecholaminbedarf während der Studie mit den miRNAs untersucht (s. Tabelle 16). In Hinblick auf die Entzündungsparameter zeigte die weniger exprimierte miR-1-3p zwei Korrelationen: Eine schwache positive Korrelation mit dem Procalcitonin ($r_s = 0,379$, $p = 0,0047$) und dem IL-6 ($r_s = 0,418$, $p = 0,0034$). Das heißt, je niedriger die miR-1-3p exprimiert wird, desto niedriger sind das PCT und IL-6. Der maximale Laktatwert während des Studienaufenthaltes korrelierte positiv mit vier runterregulierten miRNAs: miR-378a-3p ($r_s = 0,450$, $p = 0,016$), miR-378i ($r_s = 0,412$, $p = 0,029$), miR-500a-3p ($r_s = 0,552$, $p = 0,002$) und miR-511-5p ($r_s = 0,381$, $p = 0,045$). Je niedriger die miRNAs exprimiert werden, desto niedriger ist der Laktatwert. Der Katecholaminbedarf während des Studienzeitraumes zeigte ebenfalls positive Korrelationen mit fünf weniger exprimierten miRNAs: miR-660-5p ($r_s = 0,474$, $p = 0,017$), miR-501-3p ($r_s = 0,464$, $p = 0,020$), miR-500a-3p ($r_s = 0,432$, $p = 0,031$), miR-1-3p ($r_s = 0,520$, $p = 0,008$) und miR-95-3p ($r_s = 0,442$, $p = 0,027$).

Ergebnisse

miRNA	Leukozyten Tag 0	PCT Tag 0	CRP Tag 0	Interleukin-6 Tag 0	Hämoglobin	Thrombozyten	aPTT	max. Laktat	Katecholaminbedarf ^a
miR-1-3p	-	0,379 (0,047)	-	0,418 (0,034)	-	-	-	-	0,520 (0,008)
miR-18a-3p	-	-	-	-	0,405 (0,033)	-	-	-	-
miR-95-3p	-	-	-	-	-	-	-	-	0,442 (0,027)
miR-150-3p	-	-0,483 (0,009)	-	-	-	-	-	-	-
miR-192-5p	-0,384 (0,044)	-	-	-	-	-	-	-	-
miR-200c-3p	-	-	-	-	-	-0,425 (0,024)	0,424 (0,024)	-	-
miR-378i	-	-	-	-	-	-	-	0,412 (0,029)	-
miR-378a-3p	-	-	-	-	-	-	-	0,450 (0,016)	-
miR-500a-3p	-	-	-	-	-	-	-	0,552 (0,002)	0,432 (0,031)
miR-501-3p	-	-	-	-	-	-0,474 (0,011)	-	-	0,464 (0,020)
miR-511-5p	-	-	-	-	-0,473 (0,011)	-	-	0,381 (0,045)	-
miR-660-5p	-	-	-	-	-0,477 (0,010)	-	-	-	0,474 (0,017)
miR-1228-5p	-	-0,394 (0,038)	-0,494 (0,009)	-	-	-	-	-	-
miR-4433b-3p	-	-0,452 (0,016)	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 16. Korrelation zwischen miRNAs und Entzündungs- und Gerinnungsparameter, sowie Katecholaminbedarf bei Sepsispatienten. Daten sind angegeben als Spearmans Korrelationskoeffizient und (p-Wert), hochregulierte miRNAs sind grau hinterlegt. Zu sehen ist die Korrelation zwischen Entzündungsparametern (Leukozyten, PCT, CRP und IL-6), dem Katecholaminbedarf als Surrogatmarker für das kardiovaskuläre Versagen bei Sepsis und den Expressionswerten signifikant regulierter miRNAs zwischen Sepsis- und Pneumoniepatienten. Dabei erfolgte die Auswertung mit allen miRNAs die in Tabelle 9 aufgeführt werden und die hier angegebenen miRNAs sind nur diejenigen, bei der eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen miRNAs und dem Quick, INR, sowie der Dauer der Antibiotikatherapie. ^a Der Katecholaminbedarf wird durch die erforderliche Dosis Noradrenalin dargestellt, um einen angemessenen mittleren arteriellen Druck zur Aufrechterhaltung der Organperfusion bei Sepsis zu erreichen. Abk.: aPTT: aktivierte partielle Thromboplastinzeit

In unserer Arbeit konnten wir eine Korrelation zwischen miRNAs und dem Hämoglobin-Wert (Hb) aufzeigen: die runterregulierten miRNAs miR-511-5p ($r_s = -0,473$, $p = 0,011$) und miR-660-5p ($r_s = -0,477$, $p = 0,010$) mit einer schwachen negativen Korrelation und die hochregulierte miR-18a-3p mit einer schwachen positiven Korrelation ($r_s = 0,405$, $p = 0,033$). Das zeigt, je weniger die miR-511-5p und miR-660-5p und je mehr die miR-18a-3p exprimiert wird, desto höher ist der Hb-Wert.

Die Gerinnung ist ein wichtiger für den Verlauf einer Sepsis mitbestimmender Faktor, denn dessen Aktivierung ist Teil des Abwehrmechanismus des Körpers.⁷⁷ Hierbei zeigten sich eine schwache negative Korrelation zwischen der Thrombozytenzahl und den weniger exprimierten miRNAs miR-200c-3p ($r_s = -0,425$, $p = 0,024$) und miR-501-3p ($r_s = -0,474$, $p = 0,011$), sowie eine schwach positive Korrelation zwischen der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) und der miR-200c-3p ($r_s = 0,424$, $p = 0,024$). Dementsprechend, je weniger die miR-200c-3p exprimiert wird, desto höher ist die Thrombozytenzahl und geringer die aPTT. Für die Parameter Quick und INR konnten keine Korrelationen nachgewiesen werden.

Bei der Bestimmung der richtigen Behandlungsdauer eines Sepsispatienten mit einer antiinfektiven Therapie, sind immer viele Faktoren zu beachten und sie sollte im interdisziplinären Behandlungsteam besprochen werden. Entzündungsparameter wie das Procalcitonin können hier in Zusammenschau mit dem Gesamtbild zur Entscheidungshilfe genutzt werden.¹⁹ In unserer Arbeit konnten wir keine Korrelation zwischen einer miRNA-Expressionsstärke und der Behandlungsdauer mit Antibiotika finden.

Zur Beurteilung der Nierenfunktion und des Risikos eines akuten Nierenversagens im stationären Verlauf, wurden die Korrelationen zwischen den miRNAs und dem Kreatinin- sowie Harnstoff-Wert an Tag 0 überprüft (s. Tabelle 17). Zusätzlich wurden sie mit dem Auftreten einer „acute kidney injury“ (AKI) gemäß der KDIGO Definition²⁵ (s. Abbildung 6) und dem Bedarf eines Nierenersatzverfahrens während der Studie (s. Tabelle 18) hin untersucht. Hierbei zeigte sich eine schwach positive Korrelation zwischen der weniger exprimierten miR-660-5p ($r_s = 0,388$, $p = 0,046$) und eine schwach negative Korrelation mit der hochregulierten miR-370-3p ($r_s = -0,419$, $p = 0,03$) und dem Kreatininwert an Tag 0. Die Höhe des Harnstoffes wies eine starke negative Korrelation mit der hochregulierten miR-1228-5p auf ($r_s = -0,556$, $p = 0,002$). Man kann die Ergebnisse folgendermaßen interpretieren: Die miR-660-5p ist beispielsweise bei Sepsispatienten weniger exprimiert als bei Pneumoniepatienten. Je weniger diese exprimiert wird, desto niedriger scheint der Kreatininwert an Tag 0 zu sein (positive Korrelation). Die miR-370-3p hingegen ist bei Sepsispatienten höher exprimiert und je mehr diese exprimiert wird, desto niedriger ist der Kreatinin-Wert (negative Korrelation).

miRNA	Kreatinin Tag 0	Harnstoff Tag 0
miR-370-3p	-0,419 (0,03)	-
miR-660-5p	0,388 (0,046)	-
miR-1228-5p	-	-0,556 (0,002)

Tabelle 17. Korrelationen der signifikant regulierten miRNAs zwischen Sepsis und ambulant erworbener Pneumonie in Zusammenhang mit Nierenretentionsparametern.

Daten sind angegeben als Spearmans Korrelationskoeffizient und (p-Wert), hochregulierte miRNAs sind grau hinterlegt. Zu sehen ist die Korrelation zwischen Nierenretentionsparametern (Kreatinin und Harnstoff) und signifikant regulierter miRNAs. Dabei erfolgte die Auswertung mit allen miRNAs, die in Tabelle 9 aufgeführt werden und die hier angegebenen miRNAs sind nur diejenigen, bei der eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden konnte.

Das Auftreten einer akuten Nierenschädigung (AKI) korrelierte mit zwei miRNAs: der hochregulierten let-7e-5p und der runterregulierten miR-501-3p. Der Bedarf einer Nierenersatztherapie bei Sepsispatienten zeigte eine signifikante positive Korrelation mit acht miRNAs: miR-200b-3p, -378a-3p, -378i, -500a-3p, -501-3p, -511-5p, -660-5p, und let-7e-5 (s. Tabelle 18). Dabei ist die miR-let-7e-5p die einzige bei Sepsispatienten mehr exprimierte miRNA. Bei den runterregulierten miRNAs bedeutet das, je weniger exprimiert, desto weniger wahrscheinlich ist der Einsatz eines Nierenersatzverfahrens. Je höher jedoch die let-7e-5p exprimiert wird, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten eines akuten Nierenversagens und der Einsatz einer Nierenersatztherapie.

Parameter	miRNA	Eta	Eta ²	Signifikanz
AKI während Studie	let-7e-5p	0,528	0,278784	0,004
	miR-501-3p	0,421	0,177241	0,026
Bedarf einer Nierenersatztherapie während der Studie	let-7e-5p	0,490	0,2401	0,008
	miR-378a-3p	0,379	0,143641	0,046
	miR-378i	0,433	0,187489	0,021
	miR-660-5p	0,409	0,167281	0,031
	miR-501-3p	0,549	0,301401	0,003
	miR-511-5p	0,418	0,174724	0,027
	miR-200b-3p	0,427	0,182329	0,024
	miR-500a-3p	0,556	0,309136	0,002

Tabelle 18. Korrelation der signifikant regulierten miRNAs zwischen ambulant erworbener Pneumonie und Sepsis in Zusammenhang mit Nierenfunktionseinschränkungen und Nierenersatztherapie. Hochregulierte miRNAs bei Sepsispatienten sind grau hinterlegt. Hier wurden die miRNAs in Bezug auf das Auftreten einer akuten Nierenschädigung (AKI: Anstieg des Serumkreatinin um $\geq 0,3\text{mg/dl}$ ($\geq 26,5 \mu\text{mol/l}$) innerhalb von 48 Stunden oder Anstieg des Serumkreatinin um das $\geq 1,5$ -fach des Ausgangswertes, welches nachgewiesen oder angenommen innerhalb der letzten 7 Tagen aufgetreten ist oder Urinausscheidung $< 0,5\text{ml/kg}$ Körpergewicht/h für mindestens 6 Stunden) und den Bedarf einer Nierenersatztherapie korreliert. Dabei wurde die miRNA als abhängige Variable ausgewählt. Der Eta-Quadrat-Koeffizient (Eta²) beschreibt wie viel Prozent der gesamten miRNA Varianz durch das Auftreten einer AKI erklärt wird (bspw. werden 27,9% der miR-let-7e-5p durch das Auftreten einer AKI erklärt). Dabei erfolgte die Auswertung mit allen miRNAs die in Tabelle 9 aufgeführt werden und die hier angegebenen miRNAs sind nur diejenigen, bei der eine signifikante Korrelation ($p \leq 0,05$) nachgewiesen werden konnte.

Regressionsanalyse bei Sepsis

Die miRNAs die mit klinischen Parametern der Sepsispatienten korrelierten, wurden ebenfalls auf ihren Zusammenhang in einer Regressionsanalyse überprüft. Tabelle 19 gibt einen Überblick der Ergebnisse. Für die Interpretation dient der Determinationskoeffizient R^2 bzw. korrigierte R^2 . R beschreibt wie sehr die Varianz der abhängigen Variable (z.B. Dauer des ITS-Aufenthaltes) durch die miRNA erklärt wird. Je näher der Wert an 1 ist, desto eher ist die Varianz zu erklären. Mit einer erhöhten Anzahl an Daten steigt automatisch der R^2 -Wert, weswegen der korrigierte R^2 -Wert den eigentlichen interpretierbaren Wert darstellt. Die Höhe des korrigierten R^2 -Wertes gibt an, wie viel Prozent der abhängigen Variable von der unabhängigen Variable vorhergesagt werden kann.

Eine Korrelation zwischen der miRNA miR-150-3p und dem APACHE II an Tag 0 konnte nicht bestätigt werden. Ebenso konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der miR-1228-5p und dem SAPS II an Tag 0 nachgewiesen werden.

Die Dauer des intensivmedizinischen Aufenthalts und den korrelierenden miRNAs konnte nur für die hochregulierte miR-150-3p bestätigt werden (korrigiertes R^2 : 0,286 mit einem p-Wert von 0,002). Daraus konnten 28,6% der Dauer des Intensivaufenthalts durch die Höhe der miR-150-3p vorhergesagt werden.

Die Regressionsanalyse folgender Parameter mit den korrelieren miRNAs ergab keine signifikanten Ergebnisse: Dauer des Klinikaufenthaltes, Dauer der Beatmung und Versterben während der Studie.

Korrelationen von Entzündungsparametern und dem miRNA-Expressionsprofil konnten für die runterregulierte miR-1-3p und dem Procalcitonin-Wert ($p < 0,001$) sowie dem IL-6-Wert ($p < 0,001$) bestätigt werden. Die Evaluation der Gerinnungsparameter brachte lediglich für die Thrombozytenzahl und die bei Sepsis weniger exprimierte miR-501-3p ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,022$).

In der Regressionsanalyse zeigt die runterregulierte miRNA miR-378a-3p einen signifikanten Zusammenhang mit der Höhe des Laktatspiegels ($p = 0,014$). Jedoch beschreibt das korrigierte R^2 von 0,181, dass nur 18,1% der Laktathöhe durch die miRNA-Expressionshöhe beschrieben werden können. Der Bedarf einer Kreislaufunterstützung durch Katecholamine korrelierte signifikant mit der bei Sepsis weniger exprimierten miR-660-5p (korrigiertes $R^2=0,688$ bei $p < 0,001$).

Bei der Beurteilung der Nierenfunktion zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Kreatinin-Wert und der runterregulierten miR-660-5p (korrigierte $R^2 = 0,196$, $p = 0,021$), sowie zwischen dem Harnstoff und der hochregulierten miR-1228-5p (korrigierte $R^2 = 0,144$, $p = 0,044$).

Ergebnisse

Pneumonie vs. Sepsis												
Parameter	miRNAs	R	R ²	Korr. R ²	Standardfehler des Schätzers	F	p-Wert von F	Regressionskoeffizient B	Standardisierter Regressionskoeffizient B	T	p-Wert von T	95% KI
APACHE II Tag 0	miR-150-3p	Keine signifikanten Ergebnisse										
SAPS II Tag 0	miR-1228-5p	Keine signifikanten Ergebnisse										
Dauer ITS-Aufenthalt	miR-150-3p	0,560	0,314	0,286	14,327	11,418	0,002	0,250	0,560	3,379	0,002	0,098 – 0,402
	miR-93-5p	Ausschluss aus der Analyse, weil keinen signifikanten Einfluss										
	miR-92a-3p											
	miR-1246											
Dauer Klinikaufenthalt	miR-1228-5p	Keine signifikanten Ergebnisse										
	miR-93-5p											
	miR-342-3p											
Dauer der Beatmung	miR-93-5p	Keine signifikanten Ergebnisse										
	miR-92a-3p											
	miR-18a-3p											
Leukozyten an Tag 0	miR-192-5p	Keine signifikanten Ergebnisse										
PCT an Tag 0	miR-1228-5p	Keine signifikanten Ergebnisse										
	miR-4433b-3p											
	miR-150-3p											
	miR-1-3p	0,867	0,751	0,741	41,198	78,448	<0,001	0,018	0,867	8,857	0,000	0,014 – 0,022
CRP Tag 0	miR-1228-5p	Keine signifikanten Ergebnisse										
IL-6 an Tag 0	miR-1-3p	0,909	0,827	0,820	37040,285	114,856	<0,001	19,405	0,909			15,668 – 23,142
Hämoglobin an Tag 0	miR-660-5p	Keine signifikanten Ergebnisse										
	miR-18a-3p											
	miR-511-5p											
Thrombozyten an Tag 0	miR-501-3p	0,432	0,187	0,156	141,971	5,980	0,022	-0,133	-0,432	-2,445	0,022	-0,245 - -0,021
	miR-200c-3p	Keine signifikanten Ergebnisse										
aPTT an Tag 0	miR-200c-3p	Keine signifikanten Ergebnisse										
Max. Laktat an Tag 0	miR-378a-3p	0,460	0,211	0,181	1,9409	6,970	0,014	0,000	0,460	2,640	0,014	0,000 – 0,000
	miR-378i	Keine signifikanten Ergebnisse										
	miR-511-5p											
	miR-500a-3p											

Tabelle 19. Fortsetzung nächste Seite

Ergebnisse

Pneumonie vs. Sepsis												
Parameter	miRNAs	R	R ²	Korr. R ²	Standardfehler des Schätzers	F	p-Wert von F	Regressionskoeffizient B	Standardisierter Regressionskoeffizient B	T	p-Wert von T	95% KI
Katecholaminbedarf ($\mu\text{g} \times \text{KgKG} \times \text{min}^{-1}$)	miR-660-5p	0,837	0,701	0,688	0,274	53,931	<0,001	0,004	0,837	7,344	0,000	0,003 – 0,005
	miR-501-3p	Keine signifikanten Ergebnisse										
	miR-500a-3p											
	miR-1-3p											
	miR-95-3p											
Kreatinin an Tag 0	miR-370-3p	Keine signifikanten Ergebnisse										
	miR-660-5p	0,443	0,196	0,164	0,697	6,103	0,021	0,003	0,443	2,470	0,021	0,001 – 0,006
Harnstoff an Tag 0	miR-1228-5p	0,383	0,147	0,114	46,533	4,464	0,044	-1,303	-0,383	-2,113	0,044	-2,571 - -0,035

Tabelle 19. Regressionsanalyse der korrelierenden miRNAs mit den klinischen Parametern von Sepsispatienten. Hochregulierte miRNAs sind grau hinterlegt. Es wurde entsprechend dem Skalenniveau die passende Regressionsanalyse ausgewählt, welche einen kausalen Zusammenhang zwischen einer abhängigen (z.B. Dauer des Klinikaufenthaltes oder die Höhe der Leukozyten) und einer unabhängigen Variable (miRNA) beschreiben kann. Bei der multiplen linearen Regressionsanalyse wurde zunächst eine schrittweise Einschlussanalyse und zur Bestätigung die Rückwärts-Ausschlussmethode gewählt. Abk.: F: F-Test; KI: Konfidenzintervall, Korr.: korrigiertes. Erklärung: R: Der Korrelationskoeffizient R gibt die Höhe eines Zusammenhangs der Variablen an. Je näher dieser Wert an 1 ist, desto stärker der Zusammenhang. R²: Der Determinationskoeffizient R² beschreibt wie sehr die Varianz der abhängigen Variable (z.B. Dauer des ITS-Aufenthaltes) durch die miRNA erklärt wird. Je näher der Wert an 1 ist, desto eher ist die Varianz zu erklären. Mit einer erhöhten Anzahl an Daten steigt automatisch der R²-Wert, weswegen der korrigierte R²-Wert den eigentlichen interpretierbaren Wert darstellt. Die Angabe des korrigierten R²-Wertes kann angeben, wie viel Prozent der abhängigen Variable von der unabhängigen Variable vorhergesagt werden kann. F-Test: Dieser überprüft die Signifikanz des Modells. Liegt der p-Wert Wert <0,05 ist von signifikanten Variablen im Regressionsmodell auszugehen. Regressionskoeffizient B: Der nicht standardisierte Regressionskoeffizient B beschreibt die Richtung und das Ausmaß der Veränderung durch die miRNA. Standardisierter Regressionskoeffizient B: Vergleich der Auswirkung zwischen den einzelnen miRNAs. Je höher der Betrag (unabhängig vom Vorzeichen), desto größer der Einfluss. t-Test (T) und Signifikanz Sig.: beschreibt, ob der Regressionskoeffizient signifikant ist (bei p < 0,05).

In Bezug auf das Auftreten einer akuten Nierenschädigung (AKI) ergab die Regressionsanalyse einen signifikanten Zusammenhang mit der bei Sepsis vermehrt exprimierten miRNA let-7e-5p ($p=0,018$) (s. Tabelle 20). Hier erwies sich eine negativ gerichtete Korrelation (Regressionskoeffizient $B = -0,025$). Die binär logistische Regressionsanalyse des Einsatzes einer Nierenersatztherapie und der miRNA-Expressionsmuster ergab nur für die miR-500a-3p ein signifikantes Ergebnis ($p=0,010$). Bei einem positivem Regressionskoeffizient B steigt die Wahrscheinlichkeit bei einem höheren Expressionsniveau der miRNA, dass das Ereignis eintritt. Ein negativer Koeffizient besagt, dass je höher die miRNA exprimiert wird, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit z.B. des Auftretens einer AKI. Mit der Odds-Ratio (OR), also der Exponentialfunktion des Regressionskoeffizienten B (e^B oder $\text{Exp}B$) kann man Aussagen bezüglich Reduktion oder Erhöhung der Eintreffwahrscheinlichkeit treffen. Steigt das Expressionsniveau der miRNA um 1, steigt die relative Wahrscheinlichkeit für das Eintreffen des Ereignisses (also das Auftreten einer AKI, einer Nierenersatztherapie oder Vorhandensein positiver kombinierter Sepsis-Scores) um die OR -1. Hat man als Ergebnis einen negativen Wert, so sinkt die Wahrscheinlichkeit um diesen Wert. Bei einer vermehrten Expression der miRNA let-7e-5p, die bei Sepsispatienten vermehrt exprimiert wird, sinkt die Wahrscheinlichkeit einer AKI ($\text{OR}-1 = 0,975-1 = -0,025$) um 2,5%. Bei einer verminderten Expression der bei Sepsispatienten weniger exprimierten miRNA miR-500a-3p, sinkt das Risiko um 2,2% im Verlauf ein Nierenersatzverfahren zu benötigen ($\text{OR}-1 = 1,022-1 = 0,022$).

Die binär logistische Regression konnte die Korrelationen zwischen den kombinierten Sepsis-Scores (gleichzeitig einen SOFA-Score ≥ 10 Punkten, einen APACHE II ≥ 20 und einen MODS ≥ 9) und den miRNAs miR-150-3p, miR-192-3p und miR-4446-3p nicht bestätigen.

Ebenso zeigte die Analyse der miR-93-5p in Bezug auf die Vorhersage, ob ein Patient verstirbt oder nicht, keine signifikanten Ergebnisse: $p = 0,303$, Odds-Ratio = 1,001 mit einem 95% Konfidenzintervall von 0,999 bis 1,004 (nicht in der Tabelle aufgeführt).

Ergebnisse

Pneumonie vs. Sepsis									
Parameter	miRNAs	Richtig „Nein“ geschätzt	Richtig „Ja“ geschätzt	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Wald	Signifikanz p-Wert	Odds-Ratio (Exp B)	95% KI
AKI während Studie	let-7e-5p	69,2%	80,0%	-0,025	0,011	5,620	0,018	0,975	0,955 – 0,996
	miR-501-3p	Ausschluss aus der Analyse, weil keinen signifikanten Einfluss							
Nierenersatztherapie während Studie	miR-500a-3p	88,9%	70,0%	0,022	0,009	6,660	0,010	1,022	1,005 – 1,039
	let-7e-5p miR-378a-3p miR-378i miR-200b-3p miR-200c-3p miR-501-3p miR-511-5p miR-660-5p miR-1228-5p	Ausschluss aus der Analyse, weil keinen signifikanten Einfluss							
Kombinierte Sepsis-Scores*	miR-150-3p miR-192-5p miR-4446-3p	Keine signifikanten Ergebnisse							

Tabelle 20. Binär logistische Regressionsanalyse der korrelierenden miRNAs mit dem Auftreten einer akuten Nierenschädigung, dem Einsatz einer Nierenersatztherapie und kombinierten Sepsis-Scores. Hochregulierte miRNAs sind grau hinterlegt. Erklärung: Bei einem positivem Regressionskoeffizient B steigt die Wahrscheinlichkeit bei einem höheren Expressionsniveau der miRNA, dass das Ereignis eintritt (z.B. AKI). Bei einem negativen Koeffizienten sinkt die Wahrscheinlichkeit. Odds-Ratio (OR: also e^B): steigt das Expressionsniveau der miRNA um 1, steigt die relative Wahrscheinlichkeit für das Eintreffen des Ereignisses (also das Auftreten einer AKI, einer Nierenersatztherapie oder positive kombinierte Sepsis-Scores) um die OR -1. Hat man als Ergebnis einen negativen Wert, so sinkt die Wahrscheinlichkeit um diesen Wert. Beispiel: Bei einer vermehrten Expression der miRNA let-7e-5p, sinkt die Wahrscheinlichkeit einer AKI (OR-1= 0,975-1=-0,025) um 2,5%. *Kombinierte Sepsis-Scores: Patienten die gleichzeitig einen SOFA-Score ≥ 10 Punkten, einen APACHE II ≥ 20 und einen MODS ≥ 9 Punkten aufwiesen. Abk.: AKI= acute kidney injury, KI= Konfidenzintervall

ROC und AUC der Sepsispatienten

In einem letzten Schritt wurden nun die korrelierenden miRNAs, die in der Regressionsanalyse bestätigt wurden, auf ihre Funktion als Biomarker hin überprüft.

Patienten mit einer Sepsis oder einem septischen Schock benötigen gegebenenfalls eine mechanische/invasive Beatmung. In unserer Sepsiskohorte wurden 25 der 28 Patienten ≥ 48 Stunden mechanisch beatmet. Eine Studie konnte zeigen, dass eine verlängerte mechanische Beatmung (≥ 48 Stunden) abhängig vom Alter und vorbestehenden Komorbiditäten, mit einer erhöhten 1-Jahres-Mortalität und verringertem funktionellen Status assoziiert ist.⁸³ Bei der Analyse der signifikant regulierten miRNAs und Begutachtung der miRNAs die eine Korrelation zur Beatmungsdauer aufwiesen (miR-93-5p, miR-92a-3p und miR-18a-3p), konnten sich die Ergebnisse in der Regressionsanalyse nicht bestätigen lassen. Demnach zeigten sich auch keine geeigneten miRNAs zur Differenzierung zwischen einer Beatmungsdauer über/gleich bzw. unter 48 Stunden (miR-93-5p (AUC=0,769; $p=0,147$), miR-92a-3p (AUC= 0,733; $p=0,194$) und miR-18a-3p (AUC= 0,600; $p=0,577$)).

Die Antibiotikatherapie ist ein wesentlicher Bestandteil der Behandlungsstrategie bei Sepsis. Dazu schreiben Brunkhorst et al. in der S3-Leitlinie zur Sepsis (2020, S.54), dass „eine Behandlungsdauer von 7–10 Tagen im Allgemeinen für die schwersten Infektionen angemessen“¹⁹ ist. Zur Einschätzung, ob ein Patient gegebenenfalls einer verlängerten antibiotischen Therapie bedarf, evaluierten wir die Nutzung der signifikant regulierten miRNAs als Biomarker. In unserer Sepsiskohorte wurden 17 der 28 Patienten (60,7%) länger als 10 Tage antibiotisch behandelt. Hierbei zeigte sich allerdings weder eine signifikante Korrelation mit der Dauer der antibiotischen Therapie, noch konnte eine miRNAs als Biomarker zur Einschätzung einer Therapie über 10 Tagen identifiziert werden.

Bei der Nutzung der miRNA als Biomarker für die Einschätzung des klinischen Verlaufes einer Sepsis bzw. eines septischen Schocks, haben wir uns die Möglichkeit einer Risikostratifizierung für das Auftreten einer „acute kidney injury“ (AKI), definiert als ein AKIN oder RIFLE-Score > 0 während der Studie, angeschaut. Unter allen signifikanten miRNAs wies die vermehrt exprimierte let-7e-5p nicht nur eine Korrelation mit dem Auftreten einer AKI auf, sondern zeigte auch ein signifikantes Ergebnis in der Regressionsanalyse ($p = 0,018$) mit einem negativen Regressionskoeffizienten B (-0,025). Das bedeutet, je höher die miR-let-7e bei Sepsispatienten exprimiert wird, desto niedriger ist die Wahrscheinlichkeit einer AKI. Für die ROC-Analyse wurde die miR-let-7e als Testvariable verwendet und das Auftreten einer AKI als positiv eingetretenes Ereignis. Dies führt zu der ROC-Kurve in Abbildung 25. Zwar erhält man eine gute AUC von 0,769, welche signifikant ist ($p = 0,016$), jedoch zeigt das Kreuzen der Diagonalen, dass das Ergebnis hier nur bedingt zu verwerten ist.

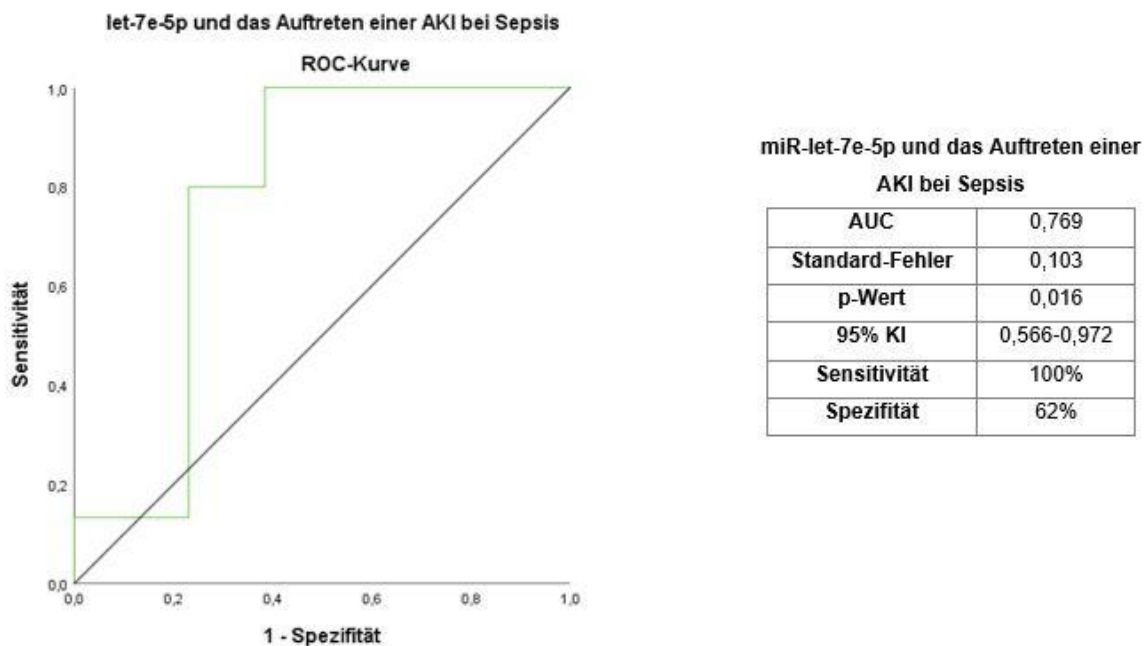
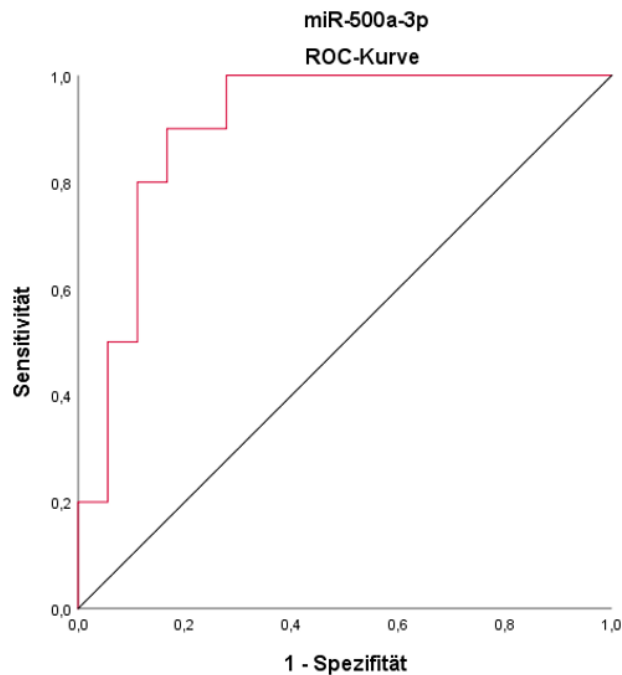


Abbildung 25. ROC und AUC der let-7e-5p und das Auftreten einer AKI bei Sepsis. Hier wurde untersucht, ob die miR-let-7e-5p das Auftreten einer „acute kidney injury“ (AKI) prognostizieren kann. In der Regressionsanalyse ist ein negativer Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau der miRNA let-7e-5p und dem Auftreten einer AKI bestätigt worden. Somit ist eine vermehrte Expression mit einem verminderten Auftreten einer akuten Nierenschädigung assoziiert. In der ROC-Analyse wurde demnach untersucht, ob durch das Expressionsniveau der miR-let-7e-5p ein AKI (Anstieg des Serumkreatinin um $\geq 0,3\text{mg/dl}$ ($\geq 26,5 \mu\text{mol/l}$) innerhalb von 48 Stunden oder Anstieg des Serumkreatinin um das $\geq 1,5$ -fach des Ausgangswertes, welches nachgewiesen oder angenommen innerhalb der letzten 7 Tagen aufgetreten ist oder Urinausscheidung $< 0,5\text{ml/kg}$ Körpergewicht/h für mindestens 6 Stunden) vorhersagen kann. Hierbei zeigte sich zwar eine signifikante AUC von 0,769 ($p = 0,016$), jedoch ist das Ergebnis aufgrund der Datensatzgröße und des Kurvenverlaufs statistisch mit Vorsicht zu bewerten.

Die ROC-Analyse der bei Sepsis weniger exprimierten miRNA miR-500a-3p, die signifikant mit dem Bedarf eines Nierenersatzverfahrens korrelierte ($p = 0,010$), erbrachte eine sehr gute AUC von 0,906 ($p < 0,05$, 95%-Konfidenzintervall 0,794 - 1,000) (s. Abbildung 26). Somit zeigt eine verminderte Expression einen verminderten Einsatz eines Nierenersatzverfahrens während des Sepsisverlaufes. Aufgrund des Konfidenzintervalles sollte die Interpretation des Ergebnisses jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. Die Berechnung des Youden-Index (Sensitivität+Spezifität-1) ergab eine bestmögliche Sensitivität von 90% und Spezifität von 83,3%.



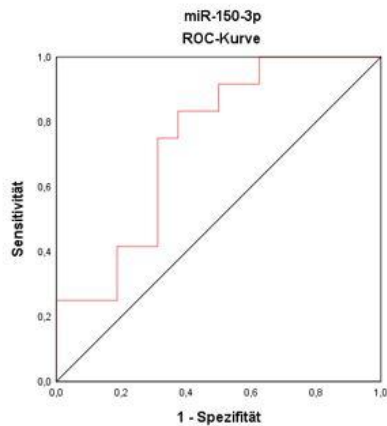
miR-500a-3p und Nierenersatztherapie

AUC	0,906
Standard-Fehler	0,057
p-Wert	<0,05
95% KI	0,794-1,000
Sensitivität	90%
Spezifität	83,3%

Abbildung 26. ROC und AUC der miR-500a-3p und den Einsatz einer Nierenersatztherapie bei Sepsis. Hier wurde untersucht, ob die miR-500a-3p den Einsatz einer Nierenersatztherapie prognostizieren kann. Die Regressionsanalyse ergab eine positive signifikante Korrelation (Regressionskoeffizient $B=0,022$, $p=0,010$), weshalb bei niedriger exprimierten miRNA-Werten mit einem verminderten Einsatz der Nierenersatztherapie zu rechnen ist. Die ROC-Analyse brachte eine sehr gute AUC (0,906) mit bestmöglicher Sensitivität von 90% und Spezifität von 83,3%. Aufgrund des Konfidenzintervalles ist das Ergebnis jedoch nur bedingt verwertbar.

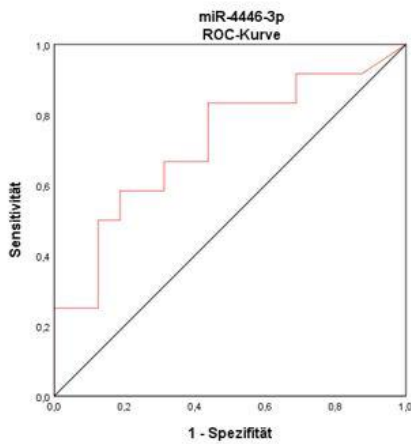
Wir untersuchten ebenfalls die Fähigkeit der signifikanten miRNAs ein Versterben des Patienten vorauszusagen. Die bei Sepsis weniger exprimierte miR-93-5p zeigte zwar eine signifikante Korrelation ($p = 0,034$), welche jedoch weder in der binär logistischen Regressionsanalyse ($p = 0,303$) noch in der ROC-Analyse bestätigt werden konnte (AUC = 0,750, $p = 0,065$, 95% KI 0,563 – 0,937).

Als letztes untersuchten wir noch, ob die signifikant korrelierten miRNAs miR-150-3p und miR-4446-3p, die beide bei Sepsis vermehrt exprimiert werden, als Biomarker für erhöhte kombinierte Sepsis-Scores genutzt werden könnten (s. Abbildung 27). Die Regressionsanalyse konnte zwar diesen Zusammenhang nicht bestätigen, dennoch führten wir eine ROC-Analyse durch. Diese zeigte für die miR-150-3p allein und in Kombination mit der miR-4446-3p folgende Ergebnisse: AUC = 0,740 mit $p = 0,033$ bzw. AUC = 0,744 mit $p = 0,032$. Eine Unterscheidung der Patienten mit erhöhten Scores ist also mit einer Sensitivität von 83,3% und einer Spezifität von 62,5% bzw. Sensitivität von 83,3% und Spezifität von 60% theoretisch möglich.



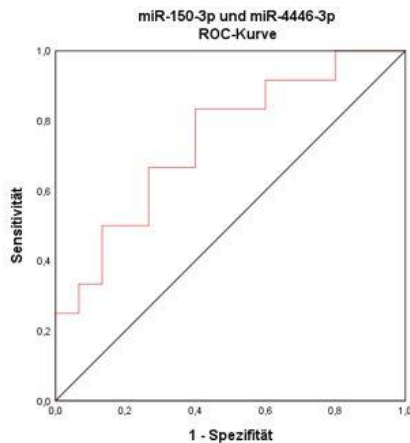
miR-150-3p und kombinierte Sepsis-Scores

AUC	0,740
Standard-Fehler	0,094
p-Wert	0,033
95% KI	0,555 – 0,924
Sensitivität	83,3%
Spezifität	62,5%



miR-4446-3p und kombinierte Sepsis-Scores

AUC	0,719
Standard-Fehler	0,101
p-Wert	0,051
95% KI	0,520 – 0,917
Sensitivität	83,3%
Spezifität	56,2%



miR-150-3p und miR-4446-3p
kombinierte Sepsis-Scores

AUC	0,744
Standard-Fehler	0,096
p-Wert	0,032
95% KI	0,557 – 0,932
Sensitivität	83,3%
Spezifität	60%

Abbildung 27. ROC und AUC der miRNAs und kombinierten Sepsis-Scores. Von den 28 Sepsispatienten erfüllten 12 die Kriterien von einem SOFA-Score ≥ 10 Punkten, einen APACHE II ≥ 20 und einen MODS ≥ 9 Punkten an Tag 0 (kombinierte Sepsis-Scores). Die positive Korrelation der miRNA mit den Scores konnte in der Regressionsanalyse nicht bestätigt werden. Die durchgeführte ROC- und AUC-Analyse zeigte eine mögliche prognostische Funktion für die miR-150-3p einzeln und in Kombination mit der miR-4446-3p. Hierbei zeigte sich, dass mit einer Sensitivität von 83,3% Patienten mit positiven kombinierten Sepsis-Scores erkannt werden könnten.

4 Diskussion

4.1 Limitationen in Bezug auf Material und Methoden

Probengewinnung arteriell versus venös

Condrat und Thompson et al., sowie unsere Arbeitsgruppe, konnten in vorherigen Studien bereits nachweisen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen arteriellen und venösen miRNA-Expressionsmuster gibt.^{35, 84} Demnach ist auch bei unseren Ergebnissen mit keinen signifikanten Unterschieden bei den Messungen der verschieden abgenommenen Proben zu rechnen.

Extraktion der Exosomen

Bei der Betrachtung der Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass verschiedene Faktoren die Quantität und Qualität, der aus Blut bzw. Serum isolierbaren extrazellulären Vesikel, beeinflussen. Dies beginnt schon bei der eigentlichen Venenpunktion und weiteren Faktoren wie der Zeit zwischen der Abnahme und der Messung, der Viskosität des Blutes und dem Vorkommen von klebrigen Proteinen wie Fibrinogen und Albumin.²⁷ Bei der eigentlichen Isolation bzw. Extraktion der Exosomen aus der Probe, sind die verwendeten Verfahren entscheidend und derzeit gibt es noch keinen einheitlichen Konsens über die Isolation von Exosomen.^{30, 31, 53, 85, 86} Unsere Arbeitsgruppe um Grätz und Schuster et al. haben im März 2024 einen Übersichtsartikel zur Nutzung als Leitfaden veröffentlicht, mit dem Versuch einer Standardisierung des Forschungsfeldes der extrazellulären Vesikel assoziierten Biomarker.⁸⁷ Nach der Blutentnahme haben wir die Serum-Röhrchen zentrifugiert, um einen möglichst zellfreien Überstand zu gewinnen. Die Differentialzentrifugation wird dazu genutzt, kleine und weniger dichte von größeren, dichteren Partikeln zu trennen. Der Erfolg ist von dem verwendeten Gerät (u.a. dem Rotor), der eingestellten Geschwindigkeit, der Probe selbst und der Größe und Dichte der Partikel abhängig.^{27, 55} Dabei sedimentieren größere schwerere Partikel und lassen kleinere im Überstand zurück, die im nächsten Schritt abpipettiert und zur weiteren Isolation wiederholt zentrifugiert werden können. Es lässt sich nicht vermeiden, dass kleine Partikel zwischen den großen verloren gehen, durch die Zentrifugation beschädigt oder in ihrem Aufbau verändert werden.^{27, 55} Des Weiteren bestehen die Überstände nicht ausschließlich aus Exosomen, da eine vollständige Reinheit aufgrund von sich überschneidenden Größen und Dichten mit anderen Partikel wie Mikrovesikel und Lipoproteine nicht gewährleistet werden kann. Deshalb ist davon auszugehen, dass unsere Ergebnisse nicht auf eine reine Isolation von Exosomen zurückzuführen ist.^{27, 28, 55} Ein Problem der Exosomen ist, dass sie bei hohen Geschwindigkeit wie bei der Ultrazentrifugation, zur

Aggregation neigen.⁸⁸ Aus diesen und weiteren Gründen, kann die korrekte Anzahl der Exosomen im Serum bereits in einer der ersten Verarbeitungsschritten maskiert werden, was folglich jede anschließende Auswertung beeinflusst. Zur Isolation haben wir uns für das miRCURY® Exosome Isolation Kit – Serum/Plasma (Qiagen, Venlo, Niederlande) entschieden. Das Vorhandensein der Exosomen und die Reinheit der Isolation wurde dann mittels NTA, TEM und Western Blot überprüft.

NTA

Die Nanotracking Analysis dient unter anderem der Messung der Vesikel-Größenverteilung (s. auch S. 48).³¹ Die NTA kann Partikel zwischen 50 nm und 1 µm differenzieren und macht sie so der Durchflusszytometrie überlegen, die Partikel ab etwa 100 nm differenzieren kann.^{51, 52, 54, 88} Durch die gleichzeitige Messung einzelner Partikel in einem Kollektiv, kann sie gegenüber der dynamischen Lichtstreuung (*engl.* dynamic light scattering, DLS), die die Partikelgröße aus dem Kollektiv bestimmt, eine exaktere Größenbestimmung in einem heterogenen Mix durchführen.⁵¹ Nachteile der NTA sind zum einen, dass die Konzentration kleinerer Partikel unterschätzt und größerer Partikel überschätzt werden kann und zum anderen, dass die Ergebnisse durch die Kalibrierung der Geräte und der Software beeinflusst werden.⁸⁹ Die Probe muss vor der Messung zusätzlich verdünnt werden. Hierbei ist der richtige Verdünnungsfaktor entscheidend, damit die Kamera alle vorhandenen Vesikel erkennt und größere Vesikel keine kleineren verdecken.³¹ Zusammenfassend ist die NTA ein geeignetes Verfahren um die Menge, Größenverteilung und Konzentration von Vesikeln in einer Probe quantitativ abzuschätzen.⁵¹

TEM

Zur Visualisierung der isolierten Exosomen haben wir die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) benutzt (s. S. 48). Ein Vorteil ist die Detektion von Partikeln ab etwa 1 nm Durchmesser, was sie durch ihre Auflösung zu einer guten Ergänzung zur NTA macht.^{31, 89} Ein weiterer Vorteil der TEM ist die Nutzung von Elektronen, welche leicht erzeugbar sind. Diese können einfach detektiert, gezählt und durch elektrische oder magnetische Felder manipuliert werden.⁵⁷ Ein Nachteil der TEM ist die aufwändige Präparation der Proben, bevor die Partikel abgebildet werden können. Außerdem muss die Konzentration der Vesikel vor der eigentlichen Messung zusätzlich durch (Ultra-)Zentrifugation erhöht werden.⁵² Durch die Fixierung und Trocknung der Proben kann die Größe und vor allem die Morphologie der zu untersuchenden Vesikel bzw. Exosomen modifiziert werden und auch der Elektronenstrahl selbst kann zu Veränderungen führen.^{31, 52} Zum Beispiel, können die Exosomen durch die Zweidimensionalität der Abbildung kelchförmig, statt der kugelförmigen

3-D Darstellung, aussehen.^{27,31} Die TEM erbringt keine quantitativen Ergebnisse und es wird im Standardverfahren auch keine Phänotypisierung ermöglicht.^{28,52} Zusammenfassend ist sie jedoch ein etabliertes Verfahren zur Bestätigung einer Exosomenpopulation, wie sie in vielen Studien angewendet wird.^{27, 41, 86, 90, 91}

Western Blot

Zur Charakterisierung der isolierten Vesikel und Identifikation von Exosomen wurde das Western Blotting angewendet. Ein Vorteil ist die Möglichkeit Proteine im Pikogramm-Bereich zu identifizieren und zu (semi-)quantifizieren.⁶⁰ Dabei wird die Sensitivität durch die Detektion der gesuchten Proteine aufgrund ihrer molekularen Masse und die Spezifität durch die spezifische Antigen-Antikörper-Interaktion bestimmt.⁶⁰ Ein Nachteil des Western Blots ist die Identifikation von Proteinen aus der gesamten Probe, inklusive möglicher nicht-exosomaler Kontamination.^{27, 28} Zwar konnten wir nachweisen, dass in unseren Proben CD63, CD81, TSG101 und Synthesin vorhanden sind, dass diese jedoch nicht exklusiv für Exosomen sind oder alle Exosomen diese ausprägen müssen, ist bekannt.^{27, 28, 92} Fehlerquellen reichen von der Vorbereitung der Probe, über die Übertragung der Menge von Proteinen auf das Gel, bis hin zu der Wahl der Pufferlösungen und der verwendeten Antikörper.⁶⁰ Diese funktionalen Antikörper müssen für das gesuchte Protein und seine eventuell gesuchten post-translationalen Modifikationen, vorhanden sein.⁶⁰ Die Spezifität dieser Antikörper ist dabei entscheidend, denn sie können eventuell nicht gewünschte Proteinsequenzen oder post-translational modifizierte Proteine mit der gleichen Bindungsstelle binden und somit das Ergebnis verfälschen.⁶⁰ Zusätzlich ist die gewählte Porengröße, der Transferpuffer und das Acrylamidgel für den Proteintransfer vom Gel auf die Membran bedeutend.⁶⁰ Zur besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden unsere Versuchsreihen stets protokollkonform und durch den selben Untersucher durchgeführt. Resümierend lässt sich sagen, dass der Western Blot durch seine langjährige Nutzung und in der Forschung etablierten Studienprotokollen eine kosteneffektive Methode darstellt, um Exosomen zu charakterisieren.

Extraktion und Quantifizierung der RNA

Es gibt eine große Anzahl an Kits zur Isolierung von miRNAs aus einem Medium. Die Auswahl des miRNeasy® Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) ist vor allem aufgrund von eigenen Erfahrungen getroffen worden. Mögliche Alternativen zur phenol-/chloroform-freien säulenbasierten Isolierung, wie sie hier Anwendung gefunden hat, ist eine kombinierte Phenol- und Säulenmethode oder eine Anwendung von allein Phenol-basierten Protokollen. Vor- und Nachteile der jeweiligen Methode können der Arbeit von El-Khoury et al.⁹³ entnommen werden. Ein ganz anderes Verfahren zur Quantifizierung von miRNAs aus

Plasma stellen Zhao, Deng und Wang et al.⁹⁴ vor: Hier wird die zirkulierende Plasma-miRNA zunächst aus ihren Proteinkomplexen gelöst und dann zu einer cDNA reverse-transkribiert. Diese wird dann als Vorlage für die Amplifikation unter anderem der miR-16 mittels quantitativer real-time-PCR genutzt. Bei diesem Verfahren kann auf eine vorherige RNA Isolation bzw. Aufschlüsselung der Untergruppen verzichtet werden.⁹⁴

Prendergast et al.⁹¹ konnte zeigen, dass die Dauer der Probenlagerung über Jahrzehnte bei -80°C die RNA-Ausbeute nicht wesentlich beeinflusst. Unsere Proben wurden nur über wenige Monate gelagert und so können unsere Ergebnisse als valide eingestuft werden.

Die Größenverteilung und Quantifizierung der isolierten miRNAs wurde mittels der gut erforschten und erprobten Kapillarelektrophorese durchgeführt (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies). Einer ihrer Vorteile ist, dass sie miRNAs aus Proben mit geringer Konzentration quantifizieren kann. Ein Nachteil ist, dass sie unter Umständen kleinere mRNA-Segmente fälschlicherweise als miRNA klassifiziert und somit die Menge an Nukleinsäure und ihre Variabilität unterschätzen kann.⁹⁵

Zur Vorbereitung der isolierten miRNAs zur Hochdurchsatzsequenzierung, wurde von unserer Arbeitsgruppe das als Goldstandard geführte RT-qPCR Verfahren³⁵ in der Bestätigungsstudie verwendet.⁷⁶ Hierbei werden aus den miRNAs mittels reverser Transkription cDNAs gebildet und im nächsten Schritt durch quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) amplifiziert.

Next-Generation Sequencing

Das 2001 vollendete Humangenomprojekt (HGP) ist wohl eines der bekanntesten und wichtigsten Kampagnen, die zur Weiterentwicklung der Hochdurchsatzsequenzierung geführt haben. Die Wissenschaftler um James Watson und Francis Collins machten es sich zur Aufgabe, das komplette humane Genom zu sequenzieren, um die Erforschung von Krankheiten zu ermöglichen.^{96,97}

Das Prinzip der Hochdurchsatzsequenzierung basiert auf der preisgekrönten Sequenzierungsmethode von Frederick Sanger, wofür er 1980 den Nobelpreis der Chemie erhielt und welche bis heute eines der genauesten Vorgehensweisen darstellt.⁹⁸ Die Sanger Didesoxymethode nutzt einen einzelnen DNA-Strang als Matrize und wird durch Hinzugabe von dNTP (Desoxy Nukleotidmonomere) und fluoreszierenden ddNTP (Didesoxy Nukleotidmonomere) mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfacht. Anschließend werden die verschieden langen Erzeugnisse mittels Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Ihre Fluoreszenz ermöglicht die Aufnahme und Abbildung ihrer Basenreihenfolge.^{98, 99}

Parallel dazu entwickelte die Arbeitsgruppe um Allan Maxam und Walter Gilbert, die ebenfalls mit einem Nobelpreis ausgezeichnet wurden, eine ähnliche Methode. Sie führt durch eine chemische Reaktion zum Kettenabbruch der DNA an der jeweils vorher bestimmten Base. Dadurch entstehen unterschiedlich lange Sequenzen und auch hier lässt sich daraus die Reihenfolge der Basen wiedergeben.⁹⁶

Den Anfang der automatisierten Sequenzierung machte 1986 Applied Biosystems, die die sog. „First-Sequencing“ Maschine AB370 herausbrachte. Diese nutzte die genauere und schnellere Methode der Kapillarelektrophorese, statt der bisher üblichen Agarose-Gelelektrophorese. Im Jahre 2005 folgte die Einführung der sog. Next-Generation Sequencing (NGS) durch die Firma Roche. Diese entwickelte die Roche454, welche die Pyrosequenzierung erstmals einsetzte. Die genannte Methode basiert auf einer Echtzeitbeobachtung der DNA-Strang-Synthese, durch Einbau von Basen. Diese werden nacheinander hinzugefügt, wodurch es zu einer Abspaltung eines Pyrophosphats kommt. Dieses Pyrophosphat (PPi) wird zur ATP-Bildung verwendet, welches mit Luciferin und Sauerstoff enzymatisch zu Oxyluciferin umgesetzt wird. Dieser Schritt führt zu einer sichtbaren Lichtreaktion, wodurch auf die respektive Base geschlossen werden kann. Die nicht eingeführten Basen werden durch das Enzym Apyrase abgebaut. Die Wiederholung dieser Schritte führt zu einer schrittweisen Darstellung der Sequenz. Diese Methode wird auch *Sequencing-by-Synthesis* genannt.^{96,98}

2006 folgte die SOLiD™ (Sequencing by Oligo Ligation Detection), ebenfalls von Applied Biosystems. Skizzenhaft beschrieben wird bei dieser Methode die Sequenz nicht durch Synthetisierung eines komplementären Strangs erfasst, sondern durch die Ligation von Sonden an Komponenten des zu erfassenden Strangs. Diese können zwei aufeinanderfolgende Basen erkennen und ein Lichtsignal abgeben. Durch die folglich unumgängliche Überlagerung von Basen lässt sich nach fünf Runden auf die eigentliche Sequenz schließen.⁹⁶ Ein weiteres System ist der Genome Analyzer (GA), welches, wie die „First-Sequencing“-Machine, auf der Sequencing-by-Synthesis Strategie basiert. 2010 folgte die Weiterentwicklung durch Illumina mit dem HiSeq-2000-System⁹⁶, dessen Folgeprodukt, der HiSeq-2500, in dieser Arbeit verwendet wurde. An die zuvor fragmentierten DNA wird an beiden Seiten ein Adapter angeheftet der komplementär zu den später verwendeten Primern ist. Dabei sind die Adapter (und folglich auch die Primer) am 3'- und 5'-Ende unterschiedlich. Eine Neusynthese kann nur durch Anbau an der 3'OH-Stelle erfolgen, weshalb nach jedem Einsatz einer Base die weitere Synthese deaktiviert wird. Dies stellt sicher, dass pro Zyklus nur eine Base inkorporiert wird. Eine CCD-Kamera nimmt die Lichtsignale nach jedem Zyklus auf und die Software gibt, über die Verwertung der Farbkodierungen, die Sequenz der DNA wieder. So können viele verschiedene Sequenzen gleichzeitig analysiert werden, was den hohen Durchsatz der Illumina Sequenzierung erklärt.⁹⁶

Heutzutage wird die Next-Generation-Sequencing unter anderem für die vollständige Sequenzierung des Genoms und gezieltere Erforschung von Mutationen und/oder Polymorphismen genutzt. Weitere Anwendungsgebiete sind die Abbildung von strukturellen Veränderungen, die unter anderem Variationen von Kopienzahlen, Translokationsknickpunkte und chromosomale Inversionen beinhalten können, sowie die genauere Untersuchung von DNA-Methylierungsmustern. Auch kann anderes genetisches Material wie die mRNA untersucht werden.^{96, 99, 100}

Die small RNA-Sequenzierungstechnologie stellt eine der neusten Methoden zur Erforschung der RNA dar. Diese auch „Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung“ genannte Vorgehensweise untersucht die Transkriptome von Zelllinien, welche die Gesamtheit der kleinen RNA-Moleküle wie mRNA, rRNA, tRNA und andere nicht-kodierende RNAs wie die miRNAs beinhalten.⁹⁶ Dabei bietet die RNA-Seq nicht nur eine Erstellung von ganzen Transkriptomprofilen, sondern ermöglicht auch durch Anwendung von biochemischen Assays die RNA-Protein-Bindung, RNA-Struktur und RNA-RNA-Interaktionen weitreichend zu untersuchen.⁶⁶ In unserer Arbeit ermöglicht sie die Identifizierung von exprimierten miRNAs in unseren Proben, die Analyse einer differentiellen Genexpression (DGE) zwischen den verschiedenen Gruppen und lässt uns Korrelationen zwischen miRNAs Expressionsniveaus und Krankheitseinflüssen untersuchen. Vorteile der RNA-Seq gegenüber der cDNA-Mikroarray Methode sind eine höhere Reproduzierbarkeit der Daten, sowie die Identifizierung und Quantifizierung von Isoformen und unbekannten Transkripten.^{66, 100}

Differentiell exprimierte Gene kennzeichnen eine unterschiedliche Expression zwischen vorher definierten Gruppen (hier: Pneumonie, Sepsis und Volunteer), die signifikant größer ist als die Variation innerhalb einer Gruppe. Allerdings können Gene fälschlicherweise als differentiell exprimiert deklariert werden, wenn Ausreißer innerhalb einer Gruppe extrem genug sind, um eine relative Variation zwischen den Gruppen vorzutäuschen.¹⁰¹ Für die nachfolgende Analyse der sequenzierten miRNAs ist die Trennschärfe (*engl. power*) der Ergebnisse wichtig. Diese beschreibt die Fähigkeit, statistisch signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen unseren Gruppen zu finden, welche von einigen Faktoren abhängig ist, wie Conesa et al.⁶⁶ erläutern: Abgesehen von der Wahl eines geeigneten Exosomenisolations-, RNA-Extraktions- und Sequenzierungsprotokolls, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll, ist die Wahl der Sequenzierungstiefe, Bibliotheksgröße (*engl. Library size*), sowie die Anzahl der Teilnehmer in den einzelnen Gruppen entscheidend. Die Bibliotheksgröße ist die Anzahl der sequenzierten Reads einer Probe und wird durch die Sequenzierungstiefe, also die Häufigkeit, wie oft ein Abschnitt gelesen wird, mitbestimmt. Ein Grund dafür ist, dass wir vor Bestimmung der DGE diejenigen miRNA aus der Berechnung ausgeschlossen haben, die nur auf niedrigen Niveau exprimiert worden sind (die Kriterien waren $\text{baseMean} \geq 50$, $\log_2\text{FC} \geq 1$ bis ≤ -1 und $p\text{-adj} \leq 0,05$), was die Power (also Trennschärfe) verbessert hat.⁶⁶ Möglichkeiten die

Trennschärfe zu steigern, wäre sicherlich eine größere Anzahl an Studienteilnehmern, eine noch höhere Sequenzierungstiefe oder eine Auswahl eines höheren FoldChange-Niveaus, wobei die Anzahl der Studienteilnehmer sicherlich einer der wichtigsten Mittel ist, die statistische Trennschärfe zu erhöhen.^{66, 101} Ein weiterer Aspekt, der einen Einfluss auf die Ergebnisse hat, ist nicht nur die Wahl der RNA-Isolationsmethode, sondern auch die Wahl der Bibliotheksherstellung. Zum Teil hat diese sogar einen größeren Einfluss als die Isolationsmethodik selbst, da die Adapterligation anfällig für Störungen ist.⁹⁵

Ein limitierender Faktor der sonst sehr vielversprechenden technischen Möglichkeiten der RNA-Sequenzierung ist sicherlich, dass zum Teil nur begrenzte Mengen an Probenmaterial zur Verfügung stehen. Des Weiteren sind die inzwischen zwar reduzierten, aber dennoch hohen Kosten der Datenerstellung und bioinformatischen Verarbeitung zu erwähnen.¹⁰¹

Es gibt keinen klaren Konsens welche Programme für die DGE-Analyse einer Studie benutzt werden sollten, da viele Faktoren die richtige Wahl beeinflussen: u.a. das Studiendesign, die Menge der zu vergleichenden Daten, die Expressionsniveaus der zu untersuchenden Sequenzen und die ausgesuchten Einstellungen des Programms. Fest steht, dass der Vergleich verschiedener Programme zum Teil unterschiedliche Ergebnisse hervorbringt, weswegen die genutzten Einstellungen und Programmversionen zur besseren Nachvollziehung stets beschrieben werden sollten.^{66, 100–102}

Die gewählte Analysesoftware DESeq2 stellt ein geeignetes Programm mit insgesamt guter Präzision, Genauigkeit und Sensitivität dar.¹⁰⁰ Es sollte jedoch beachtet werden, dass Vergleiche mit anderen Programmen eine eher konservative Berechnung des DESeq2 hervorbrachte und es somit sein kann, dass die tatsächliche Anzahl an differentiell exprimierten Genen höher ist. Gleichzeitig hätte die Kombination von bis zu fünf Programmen bessere Ergebnisse liefern können, allerdings ist dies mit deutlich mehr Aufwand und Kosten verbunden und die Qualität der DESeq2-Ergebnisse wurde mehrfach bestätigt.^{101, 102}

Normalisierung der Daten

Damit zuverlässige Ergebnisse generiert werden können, sollten die Versuchsbedingungen kontrolliert werden; darunter das Probenvolumen, die RNA-Isolation sowie -Integrität und die Effizienz der cDNA-Synthese, mit zusätzlicher Rücksichtnahme auf die allgemeine transkriptionelle Aktivität des untersuchten Gewebes oder der Zellen. Zur Normalisierung dieser Faktoren der Analyse bietet es sich an, ein oder besser mehrere interne Kontrollgene zu verwenden, deren Expression nicht zwischen verschiedenen Geweben und Zellen variiert oder durch mögliche Krankheiten, Therapien oder Studiendesigns beeinflusst wird.^{103, 104}

Eine Möglichkeit solche Kontrollgene zu ermitteln, ist der Algorithmus geNorms. Dieser nutzt das Prinzip der paarweisen Berechnung eines Stabilitätsmaßes M , welches als die

durchschnittliche paarweise Variation eines bestimmten Gens im Vergleich mit allen anderen Kontrollgenen definiert ist. Je niedriger M , desto stabiler ist die Expression des Gens. GeNorm rechnet für jedes Gen die Stabilität aus und schließt solche mit einer geringen Stabilität, also mit einem hohen M , aus und wiederholt diese Schritte bis zum Schluss die zwei stabilsten Gene übrigbleiben. Diese werden dann zur Berechnung eines Normalisierungsfaktors (NF) herangezogen. GeNorms bezieht in seine Berechnungen den Variationskoeffizient V mit ein, welcher systematische Fehler, wie z. B. Pipettier- oder Enzymvariationen, widerspiegelt.¹⁰⁴

Eine andere Möglichkeit solche Kontrollgene zu identifizieren ist der in dieser Arbeit genutzte NormFinder. Dieser Algorithmus nutzt statt der „pairwise-comparison“ die „model-based“ Methode. NormFinder erstellt automatisch für eine Gruppe von Genen den jeweiligen Stabilitätswert (*stability value*). Dieser Wert spiegelt die Intra- und Inter-Gruppen Expressionsvarianz der Gene wider. Ein Gen, welches zur Normalisierung aller Gene genutzt wird, sollte nämlich zum einen innerhalb einer Gruppe (intra) und im Vergleich zu anderen Gruppen (inter) stabil exprimiert werden. NormFinder stellt eine Liste der geeigneten Gene auf und hilft dabei die richtige Anzahl an Genen zur Normalisierung der vorhandenen Proben der RT-qPCR festzustellen.¹⁰³ In unserer Arbeit wurde hierdurch die miR-30d-5p als internes Kontrollgen bestimmt. Eine weitere Möglichkeit, Varianzen einer Studie auszugleichen, sind festgelegte Mengen synthetisch hergestellter externer Kontrollgene, sog. externe „spike-in“-Kontrollen. Ein solches Beispiel ist der bei uns verwendete UniSp6. Nachteile dieser Methode sind, dass Faktoren, die vor Hinzugabe des externen Kontrollgens die Ergebnisse beeinflussen, wie z. B. die Probensammlung und -aufbewahrung, nicht ausgeglichen werden können.¹⁰⁵

Aktuell gibt es noch keinen allgemein gültigen Konsens bezüglich der richtigen Normalisierungsstrategie, weder bezüglich des verwendeten Programms, noch ob besser interne oder externe Referenz- bzw. Kontrollgene verwendet werden sollten.^{105, 106} Nichtsdestotrotz ist es unsere Ansicht, dass die kombinierte Verwendung beider Normalisierungsverfahren unsere Ergebnisse zuverlässig und reproduzierbar macht.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Exosomen und die microRNA

Die Erforschung von Exosomen und ihrem miRNA-Gehalt beginnt mit der Ausarbeitung eines geeigneten Studiendesigns bezüglich der Patientenkohorten und des zu untersuchenden Materials (in unserem Fall venöses bzw. arterielles Blut). Es gibt die Vermutung, dass statt Blut eher Lympheflüssigkeit und Gewebeflüssigkeit die Hauptlokalisation für die Kommunikation zwischen Zellen mittels extrazellulärer miRNA darstellt. Gewebeflüssigkeit hat eine größere Absorptionsfläche und die Flussgeschwindigkeit in der Lymphe ist geringer als die im Blutstrom, was die Bedingung für einen miRNA Transfer begünstigt.³⁶ Nach der Probenentnahme folgt die Isolation der Exosomen. Diese steht vor besonderen Herausforderungen, da nach einer Schätzung die Exosomenkonzentration, abhängig vom untersuchten Material, zwischen $6,06 \times 10^7/\mu\text{l}$ bis $7,79 \times 10^9/\mu\text{l}$ in dendritischen Zellen bzw. Sperma⁴¹ oder $0,21 - 1,08 \times 10^8/250 \mu\text{l}$ in Blutplasma¹⁰⁷ variieren kann. Chevillet und Kang et al. haben gezeigt, dass durchschnittlich lediglich eine Kopie einer gegebenen miRNA pro Exosom zu finden ist. Dies wirft die Frage auf, ob die Kommunikation durch Exosomen zwischen Zellen eventuell durch die Anzahl der Exosomen, statt durch die Menge der miRNA in einem Exosomen, reguliert wird.^{41, 45} Mullokandov und Baccarini et al. schätzen die benötigte Anzahl an Kopien einer miRNA auf 100 bis 1000 pro Zelle, um einen Einfluss auf die Genexpression zu haben.⁴⁶ Damit solche Mengen erreicht werden können, müssen die jeweiligen miRNAs entweder in der Zelle selbst hergestellt oder von anderen Orten dorthin transportiert werden. Die Gesamtkonzentration der miRNA im Blutplasma wird auf etwa 0,25 pM ($1,5 \times 10^8$ Moleküle pro mL Plasma) geschätzt, welches deutlich unter der geschätzten Konzentration innerhalb einer Zelle ist.³⁶ Es muss also alternative Wege geben, die Anzahl der miRNAs durch verschiedene Mechanismen zu erhöhen. Dies kann beispielsweise durch eine schnellere Aufnahme von mehr Exosomen mit geringer miRNA-Konzentration sein, die Aufnahme einiger weniger Exosomen mit einer sehr viel höheren miRNA-Konzentrationen oder es kommt durch die lange Halbwertszeit (bis zu 72 Stunden) von miRNAs zu einer Kumulation in der Zelle.^{41, 46} Andere Hypothesen sind, dass nicht die Konzentration bzw. die Anzahl der miRNA entscheidend ist, sondern ihre Aktivität.⁴⁶ Die Eingliederung der miRNA in Exosomen, die als Transportmittel fungieren können, ist komplex und an vielen Teilschritten beeinflussbar. Beispielsweise kann die mit dem RISC assoziierte miRNA-Menge erheblich von der Gesamtmenge der miRNA in der Ursprungszelle abweichen, wobei die genauen Sortierungsmechanismen bisher nicht vollständig verstanden sind. Faktoren wie die Konzentration und das Verhältnis von miRNA und ihrem mRNA-Zielen, werden diskutiert.³⁶

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass wir es uns zum Ziel gemacht haben, an Exosomen gebundene miRNA zu untersuchen. *In vitro* Studien zeigen jedoch, dass nur ein kleiner Prozentsatz der zirkulierenden miRNA überhaupt an ECVs gebunden ist. Der Großteil ist vermutlich frei bzw. an Ribonukleotid-Protein-Komplexen (RNP-Komplexe) gebunden. Diese und andere (zum Beispiel an Ago gebundene) miRNAs können unsere Ergebnisse beeinflusst haben. Diesbezüglich wird diskutiert, ob diese „freien“ miRNAs von Ursprungszellen bestimmter Organe bei Zellstress und -untergang sezerniert werden.^{36, 41} Diese Aspekte sollten bei Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, da es sicherlich Sortierungs- und Transportmechanismen für miRNAs gibt, an die wir zum jetzigen Zeitpunkt in der miRNA-Forschung noch gar nicht denken.

Infektionen und die miRNA

Die Rolle der miRNA in Hinblick auf Infektionen ist vielseitig. Hierbei kommt es nicht nur auf die einzelne, sondern auch auf die Konstellation vieler miRNAs an. Während einige einen entzündungshemmenden Einfluss haben (z.B. miR-146a), wirken sich andere pro-inflammatorisch aus (z.B. miR-155).^{45, 108} Dies wird noch durch den Einfluss der Entzündungsätiologie verkompliziert, denn es konnte gezeigt werden, dass bestimmte bakterielle und virale Erreger das Expressionsprofil vieler miRNAs beeinflussen können.^{35, 109, 110} Zhang et al. haben anhand einer Studie mit Mäusen gezeigt, dass die Mikrovesikel-assoziierte miR-223 und miR-142 das NLRP3-Inflammasom supprimieren und so eine anti-inflammatorische Aufgabe in Hinblick auf eine pulmonale Entzündung erfüllen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Entzündung durch das gram-negative Bakterium *Klebsiella pneumoniae* durch die Expression der vorher genannten miRNAs, die Inflammation eingedämmt hat.⁴⁴

Eine Limitation dieser Arbeit ist, dass wir das exosomale microRNA-Expressionsmuster nicht in Zusammenhang mit der Infektionsätiologie unserer Patienten betrachtet haben. In einigen Fällen war ein verursachender Erreger nicht feststellbar, welches die häufig frustrierte Erregerisolation (z.B. in Blutkulturen oder im Sputum) im klinischen Alltag widerspiegelt.

Pneumonie und die miRNA

Wir untersuchten die Fähigkeit aus dem miRNA-Expressionsprofil der Pneumonieklienten eine miRNA als Biomarker zu etablieren, die einen schweren Verlauf prognostizieren kann.

In unserer Pneumoniekohorte waren gegenüber gesunden Probanden einige miRNAs von Interesse (s. Tabelle 21).

miRNA	Expression Pneumonie vs. Volunteers	Signifikante Korrelation zu Variablen	Schlussfolgerung	Interpretation	Signifikanz in der Regressionsanalyse
miR-215-5p	↑	negative Korrelation zum CURB-65 Score	Je höher die Expression, desto geringer der CURB-65 Score	Möglicher Hinweis auf besseren Verlauf.	nicht signifikant
miR-127-3p	↑	positive Korrelation zum CURB-65 Score	Je höher die Expression, desto höher der CURB-65-Score	Möglicher Hinweis auf schweren Verlauf.	nicht signifikant
		negative Korrelation zur Leukozytenzahl	Je höher die Expression, desto geringer die Leukozytenzahl	Möglicher Hinweis auf besseren Verlauf.	signifikant
miR-4732-5p	↑	Positive Korrelation zum IL-6 Wert	Je höher die Expression, desto höher ist der IL-6 Wert	Mögliche proinflammatorische Wirkung, möglicher Hinweis auf schweren Verlauf.	nicht signifikant
miR-193b-5p	↓	Positive Korrelation zum CURB-65 Score	Je niedriger die Expression, desto niedriger der CURB-65 Score	Möglicher Hinweis auf besseren Verlauf.	nicht signifikant
miR-193a-5p	↓	Positive Korrelation zur Dauer des Klinikaufenthaltes	Je niedriger die Expression, desto kürzer der Klinikaufenthalt	Möglicher Hinweis auf besseren Verlauf	signifikant
miR-145-3p	↓	Negative Korrelation mit dem Hämoglobinwert	Je niedriger die Expression, desto höher der Hämoglobinwert	Möglicher Hinweis auf besseren Verlauf, weniger Transfusionsbedarf	signifikant
miR-320d	↓	Positive Korrelation mit dem Harnstoff	Je niedriger die Expression, desto niedriger der Harnstoff	Möglicher Hinweis auf besseren Verlauf (weniger Harnstoff, weniger Nierenversagen)	signifikant

Tabelle 21. Auszug unserer signifikant veränderten exprimierten miRNAs bei Pneumonie gegenüber gesunden Probanden mit Interpretation. Hier ist nur ein Auszug der in unserer Arbeit signifikant verändert exprimierten miRNAs zwischen Pneumoniepatienten und gesunden Probanden. Die genauen Berechnungen der Korrelationen können in Tabelle 12 und die der Regressionsanalyse in Tabelle 13 nachgelesen werden. Die Interpretation beruht lediglich auf Schlussfolgerungen und muss in weiteren Studien bestätigt werden.

Der CURB-65-Score wird zur Einschätzung des Mortalitätsrisikos eines Patienten mit Pneumonie eingesetzt. Dabei zeigen die Punktzahlen 0 und 1 ein geringes Risiko (Mortalitätsrisiko <2%) und Patienten können ambulant behandelt werden. Ab 2 Punkten (Mortalitätsrisiko 9%) und höher (Mortalitätsrisiko >19%) sollten Patienten eine stationäre Behandlung und gegebenenfalls intensivmedizinische Überwachung erhalten. Andere Parameter wie das Albumin, das mit der Schwere einer Pneumonie in Verbindung gebracht worden sind, werden nicht routinemäßig bestimmt und eignen sich deshalb nicht für die flächenhafte Einsetzung als Biomarker.¹⁰ Eine Alternative zum CURB-65-Score ist die Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP) und Procalcitonins (PCT), welche signifikant mit dem CURB-65-Score korrelieren. Gerade dem PCT wird teilweise eine bessere Funktion als Indikator für die Schwere einer Pneumonie und dem Mortalitätsrisiko zugesprochen.¹ Laut der deutschen Leitlinie von 2016, ist bei einem schweren Verlauf der ambulant erworbenen Pneumonie eine Prüfung der PCT und CRP-Werte an Tag 3 - 4 zur Verlaufskontrolle indiziert, wobei ein Abfall der Werte „ein guter Prädiktor für klinisches Ansprechen“ ist.⁶

In Hinblick auf den CURB-65-Score konnten wir folgende Korrelationen nachweisen: die runterregulierte miR-193b-5p, die stark positiv mit dem CURB-65-Score korrelierte ($r_s = 0,667$, $p = 0,018$) und die miR-215-5p, die eine stark negative Korrelation aufwies ($r_s = -0,613$, $p = 0,034$). Die vermehrt exprimierte miR-127-3p zeigte eine positive Korrelation ($r_s = 0,587$, $p = 0,045$). In der Regressionsanalyse konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden. Wir konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen den miRNAs und dem CRP bei Pneumoniepatienten nachweisen und das PCT korrelierte negativ allenfalls knapp signifikant mit der miR-543 ($r_s = -0,632$, $p = 0,050$), welcher in der Regressionsanalyse nicht bestätigt werden konnte ($p = 0,126$). Weitere Entzündungswerte wie die Leukozytenzahl, korrelierte negativ mit den vermehrt exprimierten miRNAs miR-127-3p und -379-5p, sowie positiv mit der weniger exprimierten miR-450b-5p. Das IL-6 korrelierte positiv mit der vermehrt exprimierten miR-4732-5p. Diese Zusammenhänge konnten jedoch lediglich für die Leukozytenzahl und die miR-127-3p in der Regressionsanalyse bestätigt werden ($p = 0,028$).

Interessanterweise haben Huang et al. in ihrer Studie zur Adenovirus-Pneumonie bei Kindern im Alter zwischen 1-3 Jahren gezeigt, dass die miR-127-3p, im Vergleich zu gesunden Probanden, hochreguliert wird ($\log_2FC\ 2,10$).¹¹¹ Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen einer vermehrten Expression bei Pneumoniepatienten ($\log_2FC\ 1,07$) bzw. einer verminderten Expression bei gesunden Probanden ($\log_2FC\ -1,26$). Wir haben allerdings keine Unterscheidung zwischen einer viralen oder bakteriellen Infektion bei unseren Messungen vorgenommen. Eine Arbeit von Peng und Wang et al. zeigte in Zell- und Tierversuchen, dass die miR-127-3p bei einer Influenza-Infektion einen inhibitorischen Effekt auf die Virusreplikation hat. Durch die Infektion kann die Expression jedoch reduziert werden und somit einen krankheitsfördernden Effekt haben.¹¹² Liu und Mao et al. haben ähnliche

Ergebnisse bei einer *Staphylococcus aureus* Pneumonie in Mäusen erheben können und zeigten, dass die miR-127 einer *S. aureus* Infektion durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems protektiv entgegenwirkt. Ebenso demonstrierten sie, dass die Verabreichung von miR-127 zu einem Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF α und IL-1 β , sowie zu einem Abfall des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, führte.¹¹³ Dies lässt Hoffnungen zu, dass der Einsatz von miRNAs auch als therapeutischen Ansatz genutzt werden könnte. Ob die oben genannten Ergebnisse auf den Menschen *in vivo* übertragbar sind und die miRNAs gar als Therapeutikum in Zukunft genutzt werden könnten, muss in weiteren Studien gezeigt werden. In unserer Studie konnten wir keine Korrelation zwischen der miR-127-3p und dem IL-6-Wert aufzeigen. Wir haben einen negativen Zusammenhang zwischen miR-127-3p Expressionsniveau und der Leukozytenzahl ($r_s = -0,671$, $p = 0,017$) zeigen können. Also je höher die miRNA exprimiert wird, desto geringer die Leukozytenzahl. Letztere wird bei Infektionen jeglicher Art als Immunantwort des Körpers sowohl vermehrt als auch vermindert gebildet.⁷⁴ Aus unserer Arbeit könnte man ableiten, dass je höher die Expression der eher protektiv wirkenden miR-127-3p ist, desto geringer ist die Entzündungsreaktion des Körpers, gezeigt durch eine geringere Leukozytose.

Im Rahmen einer Pneumonie, haben Huang, Feng und Zhai et al. eine erhöhte Expression der miR-193b in Patienten mit milder Pneumonie gegenüber gesunden Probanden und eine noch höhere Expression bei schwerer Pneumonie nachgewiesen.¹¹⁴ Dies deckt sich nicht mit unseren Ergebnissen. Wir haben eine verminderte Expression der miR-193b-5p in unserer Pneumoniekohorte festgestellt (log2FC -1,61) bzw. eine erhöhte Expression bei gesunden Probanden (log2FC 1,50). Auch im Vergleich Sepsis/septischer Schock gegenüber gesunden Probanden, war die miR-193b-5p bei Sepsispatienten und solchen mit septischen Schock weniger exprimiert (log2FC -1,72 bzw. log2FC -1,48). Beim Vergleich Pneumonie und Sepsis/septischer Schock wurde die miR-193-5p in unseren Untersuchungen nicht als signifikant verändert detektiert. Wang und Zhang et al. zeigten eine erhöhte Expression von der miR-193b bei Sepsispatienten, die aufgrund der Schwere der Erkrankung verstorben sind gegenüber Sepsispatienten, die überlebt haben.¹¹⁵ Warum unsere Ergebnisse sich von anderen Studien unterscheiden ist nicht sicher zu erklären. Mögliche Ursachen können technische Unterschiede, Probanden oder aber nicht untersuchte Confounder sein.

Neben der Verlaufsbeurteilung von Entzündungswerten, spricht auch ein verlängerter Klinikaufenthalt für einen schwereren Verlauf. 2001 konnten Menéndez und Ferrando et al. zeigen, dass 90% der Komplikationen die zu einem verlängerten Aufenthalt geführt haben, in den ersten 72 Stunden nach stationärer Aufnahme aufgetreten sind.⁸¹ Die Länge der stationären Therapie bei Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie ist nicht nur mit höheren Kosten für das Gesundheitssystem assoziiert, sondern vor allem mit den zugrundeliegenden Komorbiditäten der Patienten. Ebenso ist die Zahl der erneuten Aufnahme

mit der vorherigen verlängerten stationären Behandlung (je nach Patientenrisiko fünf bzw. sieben Tage) assoziiert.⁸¹ Es gibt einige Arbeiten die sich mit Prädiktoren für die Dauer des stationären Aufenthaltes beschäftigten, darunter eine die Faktoren wie Vorerkrankungen, klinische Parameter und soziale Aspekte mit einschlossen. Nach unserem Wissen gibt es derzeit keine, die die Möglichkeit einer miRNA als Biomarker untersucht hat.⁸² Wir konnten aufweisen, dass die bei Pneumoniepatienten weniger exprimierte miRNA miR-193a-5p positiv mit der Länge des Klinikaufenthaltes korreliert ($r_s=0,789$, $p=0,002$), welche in der Regressionsanalyse bestätigt wurde ($p<0,05$). Bei der weiteren Untersuchung als möglicher Biomarker ergab die ROC-Analyse, wahrscheinlich aufgrund unserer Datengröße, keine verwertbaren Ergebnisse. Ortiz-Quintero et al. veröffentlichten 2020 eine Arbeit, in der sie einen Zusammenhang zwischen der miR-193a-5p und intestinalen Lungenabnormalitäten (ILA) bei asymptomatischen Patienten gezeigt haben. Diese asymptomatischen Personen ≥ 60 Jahre, zeigten Auffälligkeiten in der Bildgebung, wie beispielsweise Verdichtungen in der hochauflösenden Computertomographie (HRCT). Die miR-193a-5p war bei ILA signifikant höher exprimiert und konnte in einer ROC-Analyse zwischen ILA-Personen und einer Kontrollgruppe unterscheiden ($AUC=0,75$).¹¹⁶ Sun und Xian et al. zeigten, dass die miR-193a-5p in extrazellulären Vesikeln einer bronchoalveolären Lavage bei beatmeten Pneumoniepatienten gegenüber beatmeten Nicht-Pneumoniepatienten erhöht war. Allerdings konnten sie keinen Unterschied im Expressionsniveau aus extrazellulären Vesikeln des Blutplasmas feststellen.¹¹⁷ In weiteren großen multi-zentrischen Studien sollte die miR-193a-5p als möglicher Biomarker für die Pneumonie validiert werden.

Die in unserer Arbeit am unterschiedlichsten exprimierten miRNAs bei Pneumonie gegenüber den gesunden Probanden waren die miR-432-5p und die miR-582-3p. Bei Pneumonie und auch bei Sepsis bzw. septischer Schock war die miR-432-5p vermehrt exprimiert im Vergleich zu gesunden Probanden (Pneumonie $\log_2FC$ 1,58, Sepsis $\log_2FC$ 2,09 und septischer Schock $\log_2FC$ 2,30). In der Literatur findet man unter anderem eine Arbeit die zeigt, dass die miR-432-5p die virale Replikation und Infektion auf Genebene beeinflussen kann und somit einen protektiven Effekt hat.¹¹⁸ Martucci und Arcadipane et al. beschreiben, dass die miR-432-5p im Verlauf einer ECMO-Therapie bei ARDS Patienten im Vergleich zu Beginn der Therapie nach 14 Tagen signifikant runterreguliert wird. Diese miRNA beeinflusst Gene, die für die Zellproliferation, das Immunsystem und die Blutgerinnung eine Rolle spielen. Außerdem könnte sie als Biomarker dienen, um Patienten mit längerem bzw. kürzerem ECMO-Bedarf zu identifizieren.¹¹⁹ Da Maués und Moreira-Nunes et al. haben gezeigt, dass die miR-432-5p bei im Labor gelagerten Thrombozytenkonzentraten an den Tagen 2-7 im Vergleich zum ersten Tag vermehrt exprimiert wird. Sie könnte somit eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Thrombozytenintegrität haben.¹²⁰ Wir konnten keinen signifikanten Zusammenhang mit der

miR-432-5p und klinischen Parametern zeigen, jedoch stieg bei uns die Expression der miRNA je schwerer die Erkrankung war (gemessen anhand des log2FC, s. oben).

Die miR-582-3p war bei Patienten mit Pneumonie, Sepsis und septischer Schock im Vergleich zu gesunden Probanden vermindert exprimiert (Pneumonie log2FC -2,20, Sepsis log2FC -1,32 und septischer Schock -1,39). Je schwerer die Erkrankung, desto weniger zeigte sich hier der Expressionsunterschied. Bei Pneumoniepatienten korrelierte das Expressionsniveau negativ mit dem Hämoglobinwert (Hb) an Tag 0 (je niedriger die miR-582-3p, desto höher der Hb-Wert). Mit der partiellen Thromboplastinzeit (pTT), als Surrogatparameter für die intrinsische Gerinnung¹²¹, korrelierte die miRNA positiv (je höher die miR-582-3p exprimiert wird, desto höher die pTT). Eine verlängerte pTT kann für eine gestörte Blutgerinnung sprechen, wird allerdings auch durch eine Therapie mit Heparin beeinflusst.¹²² Eine Arbeit zeigt eine vermehrte Expression von der miR-582 bei Patienten mit einer tiefen Venenthrombose gegenüber gesunden Probanden.¹²³ Betrachtet man dieses Ergebnis und unsere Korrelation mit der partiellen Thromboplastinzeit, scheint diese miRNA durchaus eine Rolle in der Gerinnungskaskade zu haben. Li et al. haben gezeigt, dass die miR-582-3p bei Leukämiepatienten weniger exprimiert wird und dass sie einen tumorsupprimierenden Effekt durch Hemmung der Zellproliferation haben kann.¹²⁴

Es gibt einen grundlegenden Aspekt, den wir in unserer Studie nicht näher untersucht haben, nämlich die Komorbiditäten der Pneumoniepatienten. Aufgrund der begrenzten Patientenkohorte (n=12) und nur wenigen die an mehreren Komorbiditäten litten, ist die Übertragbarkeit dieser Studie auf die Gesamtbevölkerung limitiert, gerade weil wir nicht den klinischen Verlauf dieser Patienten beobachtet haben. Denn Indikatoren für einen ungünstigen Verlauf sind Vorerkrankungen und deren Verschlechterung in Zusammenhang mit der Pneumonie (z. B. chronische pulmonale oder kardiale Erkrankungen). Es geht sogar so weit, dass einer der Hauptgründe für eine verlängerte stationäre Therapie bei einer Pneumonieerkrankung, die Instabilität von zugrundeliegenden Vorerkrankungen ist.⁸¹

Ausgewählte miRNAs in der Literatur

Andere Studiengruppen haben die Rolle verschiedener miRNA-Familien in Zusammenhang mit Erkrankungen untersucht. Tabelle 22 ist ein Ausschnitt einiger ausgewählter miRNAs und deren Forschungsergebnisse.

miRNA (Expression in unserer Arbeit gegenüber gesunden Probanden)	In der Literatur: ↑ Expression	In der Literatur: ↓ Expression
	Interaktion mit Sars-CoV-2 Genen bei einer Infektion (u.a. Beeinflussung der viralen Replikation, Infektion und Fortbewegung) und Interaktion mit Genen in der Wirtslunge ¹¹⁸	
miR-432-5p (↑)	- Vermehrte Expression bei gelagerten Thrombozytenkonzentraten an Tag 2-7 ggü. Tag 1 ¹²⁰	- Signifikante Runterregulation nach 14 Tagen ECMO-Therapie bei ARDS-Patienten im Vergleich zu vor der ECMO-Therapie. Möglicher Biomarker, um Patienten mit einem längeren bzw. kürzerem ECMO-Bedarf zu identifizieren. ¹¹⁹
miR-215-5p (↑)	- Osteosarkom (c) ¹²⁵ - Bei Leberzirrhose im Vergleich zu leichter bis moderater Leberfibrose bei Hepatitis C Patienten (c) ¹²⁶	- LPS-induzierte Sepsis in Herzmuskelzellen von Ratten (H9c2) ¹²⁷ - Bei Patienten mit Akromegalie ggü. Gesunden (c) ¹²⁸
miR-127-3p (↑)	- Adenovirus-Pneumonie bei Kindern im Alter zwischen 1-3 Jahren (c) ¹¹¹	- Humanes T-lymphotropes Virus 1 (c miR-127) ¹²⁹ - Influenza-Pneumonie (Tierversuche) ¹¹²
miR-4732-5p (↑)	- In Exosomen aus Makrophagen nach in-vitro Infektion mit Mycobacterium bovis (Bacillus Calmette-Guerin) * ¹³⁰	
miR-27a (↓)	- Akute Lungenembolie ¹²³	- In bronchialen Epithelzellen bei Patienten mit Asthma ¹³¹
miR-145-3p (↓)	- Akuter Myokardinfarkt (c) ¹³²	- In-vitro bei Lungenepithelzellen 72h nach SARS-Cov2-Infektion ¹³³ - In Exosomen bei Sepsispatienten gegenüber Gesunden (c) * ¹³⁴ - In Lungengewebe von sepsis-induzierter Lungenschädigung bei septischen Mäusen* ¹³⁴ - Bei Ratten mit venöser Thrombose* ¹³⁵
miR-320d (↓)	- Experimentell in Endothelzellen nach Stimulation mit den Zytokinen IL-1β, IL-γ und TNFα ¹³⁶	
miR-193a-5p (↓)	- Hypertrophe Kardiomyopathie ¹³⁷ - Intestinale Lungenabnormalitäten bei asymptomatischen Personen (c) ¹¹⁶ - Humanes T-lymphotropes Virus 1 (c) ¹²⁹	- Lungenkarzinommetastasen ¹³⁷
miR-193b-5p (↓)	- Lungenkarzinom(miR-193b) ¹³⁷ - Pneumonie (c) * ¹¹⁴ - Erhöhte Expression bei verstorbenen Sepsispatienten gegenüber Überlebenden (c) * ¹¹⁵ - In EVs aus bronchoalveolärer Lavage von beatmeten Pneumoniepatienten ¹¹⁷	- Mammakarzinom (miR-193b) ¹³⁷ - Ovarialkarzinom (miR-193b) ¹³⁷
miR-582-3p (↓)	- Kolonkarzinom ¹²⁴ - Tiefe Venenthrombose (miR-582) ¹²³	- Leukämie, vor allem Akut myeloische Leukämie ¹²⁴ - Lungenkarzinom ¹²⁴

Tabelle 22. Auswahl einiger signifikant regulierten miRNAs in unserer Pneumonekohorte in der Literatur. (c) zirkulierende miRNAs, ↑: vermehrt exprimiert/hochreguliert, ↓: weniger exprimiert/runterreguliert, *hier keine Differenzierung zwischen -3p und -5p vorgenommen. Abk.: LPS: Lipopolysaccharid. Anm.: Diese Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Sepsis und die miRNA

Die Sepsis ist eine relevante Erkrankung. Eine Metaanalyse von Studien der Jahre 1979 bis 2015 aus 27 Ländern mit hohem Einkommen, schätzte die Inzidenz der stationär behandelten Patienten mit einer Sepsis auf 288 pro 100 000 Personenjahre und die der schweren Sepsis, auch wenn hier die Definitionen und Einschlusskriterien sehr variabel sind, auf 148 pro 100 000 Personenjahre. Trotz Abwärtstrend der Letalität in den letzten Jahren, liegt diese bei der Sepsis schätzungsweise immer noch bei 17% und die der schweren Sepsis bei 26%. In dieser Metaanalyse wird die Sepsis nach verschiedenen Klassifikationssystemen definiert (u.a. nach der American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine consensus criteria oder ICD-Kodierung). Nimmt man diese Zahlen und überträgt sie auf die Weltbevölkerung, so kommt man auf jährliche Zahlen von 31,5 Millionen Sepsis- und 19,4 Millionen schwere Sepsispatienten mit etwa 5,3 Millionen Todesfällen.¹³⁸ Das Forschungsfeld der Sepsisdiagnostik ist breit und es werden nicht nur klinische Scores, sondern auch viele verschiedene Biomarker untersucht. Beispielsweise Glykoproteine, Entzündungsparameter wie das Calprotectin, die intestinale Flora, aber auch RNAs wie die miRNA oder langkettige nicht-kodierende RNA (*engl.* lncRNA).¹³⁹

Tabelle 23 gibt einen Überblick über die signifikant verändert exprimierten miRNAs in unserer Sepsisgruppe bzw. Patienten mit septischen Schock gegenüber Pneumoniepatienten. In der Tabelle findet sich auch eine Übersicht über die signifikanten Korrelationen zu klinischen Parametern. Es wurde ein Versuch der Interpretation unternommen, welche jedoch in weiteren Studien eingehend untersucht werden muss.

Diskussion

miRNA (Expression bei Sepsis- gegenüber Pneumoniepatienten)	Signifikante Korrelation zu Variablen	Schlussfolgerung	Interpretation	Signifikanz in der Regressionsanalyse
miR-1228-5p (↑)	Negative Korrelation zum SAPS-II Score an Tag 0	Je höher die Expression, desto geringer der Sepsis Score	möglicherweise protektiv zu Beginn der Erkrankung	nicht signifikant
	Positive Korrelation zur Dauer des Klinikaufenthaltes	Je höher die Expression, desto länger der Klinikaufenthalt	Hinweis auf einen komplizierten Verlauf	nicht signifikant
	Negative Korrelation zum PCT an Tag 0	Je höher die Expression, desto geringer der PCT-Wert	möglicherweise protektiv zu Beginn der Erkrankung	nicht signifikant
	Negative Korrelation zum CRP an Tag 0	Je höher die Expression, desto geringer der CRP-Wert/Entzündungsreaktion	möglicherweise protektiv zu Beginn der Erkrankung	nicht signifikant
	Negative Korrelation zum Harnstoff an Tag 0	Je höher die Expression, desto geringer die Nierenschädigung	möglicherweise protektiv zu Beginn der Erkrankung	signifikant
miR-4433-b-3p (↑)	Negative Korrelation zu PCT an Tag 0	Je höher die Expression, desto geringer der PCT-Wert	möglicherweise protektiv zu Beginn der Erkrankung	nicht signifikant
miR-4446-3p (↑)	Positive Korrelation zu kombinierten Sepsis-Scores*	Je höher die Expression, desto höher die Sepsis-Scores	Hinweis auf eine schwere Sepsis	nicht signifikant, ROC-Analyse durchgeführt
miR-370-3p (↑)	Negative Korrelation zum Kreatinin-Wert an Tag 0	Je höher die Expression, desto niedriger ist der Kreatinin-Wert	Hinweis auf weniger Nierenschädigung an Tag 0	nicht signifikant
miR-let7e-5p (↑)	Korrelation zum Auftreten einer akuten Nierenschädigung (AKI)	Je höher die Expression, desto weniger wahrscheinlich ist eine AKI. Vorhersage einer AKI durch 27,9% des miRNA-Expressionsniveau möglich	Möglicherweise Nutzung als Screening-Parameter für Nierenschädigung	Signifikant bei negativ gerichteter Korrelation, ROC-Analyse durchgeführt
	Korrelation zum Bedarf einer Nierenersatztherapie	Vorhersage des Bedarfs einer Nierenersatztherapie durch 24% des miRNA-Expressionsniveau möglich	Möglicherweise Nutzung als Screening-Parameter für Dialysepflichtigkeit	nicht signifikant

Tabelle 23. Fortsetzung nächste Seite

Diskussion

miRNA (Expression bei Sepsis- gegenüber Pneumoniepatienten)	Signifikante Korrelation zu Variablen	Schlussfolgerung	Interpretation	Signifikanz in der Regressionsanalyse
miR-150-3p (↑)	Positive Korrelation zum APACHE-II Score an Tag 0	Je höher die Expression, desto höher der APACHE-II Score	Hinweis auf eine schwere Sepsis	nicht signifikant
	Positive Korrelation zu den kombinierten Sepsis-Scores*	Je höher die Expression, desto höher die Sepsis-Scores	Hinweis auf eine schwere Sepsis	nicht signifikant, ROC- Analyse durchgeführt
	Positive Korrelation zur Dauer des Intensivaufenthaltes	Je höher die Expression, desto länger der Intensivaufenthalt	Hinweis auf eine schwere Sepsis/ schweren Verlauf	signifikant
	Negative Korrelation zum PCT- Wert an Tag 0	Je höher die Expression, desto geringer der PCT-Wert	möglicherweise protektiv zu Beginn der Erkrankung	nicht signifikant
miR-378a-3p (↓)	Positive Korrelation zum maximalen Laktatwert	Je niedriger die Expression, desto niedriger der Laktatwert	Möglicherweise protektiv	signifikant
	Korrelation zum Bedarf einer Nierenersatztherapie	Vorhersage des Bedarfs einer Nierenersatztherapie durch 14,4% des miRNA- Expressionsniveau möglich	Möglicherweise Nutzung als Screening-Parameter für Dialysepflichtigkeit	nicht signifikant
miR-93-5p (↓)	Negative Korrelation zur Dauer des Intensivaufenthaltes	Je niedriger die Expression, desto länger der Intensivaufenthalt	Möglicherweise Nutzung zur Abschätzung eines schweren/komplizierten Verlaufs, möglicherweise Hemmung der Expression bei schwerer Sepsis	nicht signifikant
	Negative Korrelation zur Dauer des Klinikaufenthaltes	Je niedriger die Expression, desto länger der Klinikaufenthalt		
	Negative Korrelation zur Dauer der Beatmung	Je niedriger die Expression, desto länger die Beatmungsdauer		
	Korrelation zum Versterben während der Studie	Vorhersage des Versterbens durch 16,2% des miRNA- Expressionsniveau möglich		
miR-92a-3p (↓)	Negative Korrelation zur Dauer des Intensivaufenthaltes	Je niedriger die Expression, desto länger der Intensivaufenthalt	Möglicherweise Nutzung zur Abschätzung eines schweren/komplizierten Verlaufs, möglicherweise Hemmung der Expression bei schwerer Sepsis	nicht signifikant
	Negative Korrelation zur Dauer der Beatmung	Je niedriger die Expression, desto länger die Beatmungsdauer		

Tabelle 23. Fortsetzung nächste Seite

Diskussion

miRNA (Expression bei Sepsis- gegenüber Pneumoniepatienten)	Signifikante Korrelation zu Variablen	Schlussfolgerung	Interpretation	Signifikanz in der Regressionsanalyse
miR-378i (↓)	Positive Korrelation zum maximalen Laktatwert	Je niedriger die Expression, desto niedriger der Laktatwert	Möglicherweise protektiv	nicht signifikant
	Korrelation zum Bedarf einer Nierenersatztherapie	Vorhersage des Bedarfs einer Nierenersatztherapie durch 18,7% des miRNA- Expressionsniveau möglich	Möglicherweise Nutzung als Screening-Parameter für Dialysepflichtigkeit	nicht signifikant
miR-660-5p (↓)	Negative Korrelation zum Hämoglobinwert	Je niedriger die Expression, desto höher der Hämoglobinwert	Hinweis für einen besseren Verlauf/ weniger Transfusionsbedarf	nicht signifikant
	Positive Korrelation zum Katecholaminbedarf	Je niedriger die Expression, desto weniger der Katecholaminbedarf	Möglicherweise protektiv/ Hinweis für einen besseren Verlauf	signifikant
	Positive Korrelation zum Kreatinin-Wert an Tag 0	Je niedriger die Expression, desto niedriger der Kreatinin-Wert an Tag 0	Hinweis auf weniger Nierenschädigung an Tag 0	signifikant
	Korrelation zum Bedarf einer Nierenersatztherapie	Vorhersage des Bedarfs einer Nierenersatztherapie durch 16,7% des miRNA- Expressionsniveau möglich	Möglicherweise Nutzung als Screening-Parameter für Dialysepflichtigkeit	nicht signifikant
miR-501-3p (↓)	Negative Korrelation zur Thrombozytenzahl	Je niedriger die Expression, desto höher die Thrombozytenzahl	Möglicherweise protektiv/ Hinweis für einen besseren Verlauf (niedrige Thrombozytenzahl bei schwerer Sepsis/Organversagen)	signifikant
	Positive Korrelation zum Katecholaminbedarf	Je niedriger die Expression, desto niedriger der Katecholaminbedarf	Möglicherweise protektiv/ Hinweis für einen besseren Verlauf	nicht signifikant
	Korrelation zum Auftreten einer akuten Nierenschädigung (AKI)	Je höher die Expression, desto weniger wahrscheinlich ist eine AKI. Vorhersage einer AKI durch 17,7% des miRNA- Expressionsniveau möglich	Möglicherweise Nutzung als Screening-Parameter für Nierenschädigung	nicht signifikant
	Korrelation zum Bedarf einer Nierenersatztherapie	Vorhersage des Bedarfs einer Nierenersatztherapie durch 30,1% des miRNA- Expressionsniveau möglich	Möglicherweise Nutzung als Screening-Parameter für Dialysepflichtigkeit	nicht signifikant
miR-342-3p	Negative Korrelation zur Dauer des Klinikaufenthaltes	Je niedriger die Expression, desto länger der Klinikaufenthalt	Möglicherweise Nutzung zur Abschätzung eines schweren/komplizierten Verlaufs, möglicherweise Hemmung der Expression bei schwerer Sepsis	nicht signifikant

Tabelle 23. Fortsetzung nächste Seite

Diskussion

miRNA (Expression bei Sepsis- gegenüber Pneumoniepatienten)	Signifikante Korrelation zu Variablen	Schlussfolgerung	Interpretation	Signifikanz in der Regressionsanalyse
miR-18a-3p	Negative Korrelation zur Dauer der Beatmung	Je niedriger die Expression, desto länger die Beatmungsdauer	Möglicherweise Nutzung zur Abschätzung eines schweren/komplizierten Verlaufs, möglicherweise Hemmung der Expression bei schwerer Sepsis	nicht signifikant
	Positive Korrelation zum Hämoglobinwert	Je niedriger die Expression, desto niedriger der Hämoglobinwert	Hinweis für einen schlechteren Verlauf/ mehr Transfusionsbedarf	nicht signifikant
miR-192-5p	Negative Korrelation zu den kombinierten Sepsis-Scores*	Je niedriger die Expression, desto höher die kombinierten Sepsis- Scores*	Hinweis auf eine schwere Sepsis	nicht signifikant
	Negative Korrelation zur Leukozytenzahl an Tag 0	Je niedriger der Score, desto höher die Leukozytenzahl	Hinweis auf eine schwere Sepsis / erhöhte Entzündungsreaktion	nicht signifikant
miR-511-5p	Negative Korrelation zum Hämoglobinwert	Je niedriger die Expression, desto höher der Hämoglobinwert	Hinweis für einen besseren Verlauf/ weniger Transfusionsbedarf	nicht signifikant
	Positive Korrelation zum maximalen Laktatwert	Je niedriger die Expression, desto niedriger der Laktatwert	Möglicherweise protektiv	nicht signifikant
	Korrelation zum Bedarf einer Nierenersatztherapie	Vorhersage des Bedarfs einer Nierenersatztherapie durch 17,5% des miRNA- Expressionsniveau möglich	Möglicherweise Nutzung als Screening-Parameter für Dialysepflichtigkeit	nicht signifikant
miR-200b-3p	Korrelation zum Bedarf einer Nierenersatztherapie	Vorhersage des Bedarfs einer Nierenersatztherapie durch 18,2 % des miRNA- Expressionsniveau möglich	Möglicherweise Nutzung als Screening-Parameter für Dialysepflichtigkeit	nicht signifikant

Tabelle 23. Fortsetzung nächste Seite

Diskussion

miRNA (Expression bei Sepsis- gegenüber Pneumoniepatienten)	Signifikante Korrelation zu Variablen	Schlussfolgerung	Interpretation	Signifikanz in der Regressionsanalyse
miR-200c-3p	Negative Korrelation zur Thrombozytenzahl	Je niedriger die Expression, desto höher die Thrombozytenzahl	Möglicherweise protektiv/ Hinweis für einen besseren Verlauf (niedrige Thrombozytenzahl bei schwerer Sepsis/Organversagen)	nicht signifikant
	Positive Korrelation zur aktivierten partielle Thromboplastinzeit (aPTT)	Je niedriger die Expression, desto geringer die aPTT	Hinweis für einen besseren Verlauf/ weniger Blutungsgefahr	nicht signifikant
	Korrelation zum Bedarf einer Nierenersatztherapie	Vorhersage des Bedarfs einer Nierenersatztherapie durch 18,2 % des miRNA- Expressionsniveau möglich	Möglicherweise Nutzung als Screening-Parameter für Dialysepflichtigkeit	nicht signifikant
miR-500a-3p	Positive Korrelation zum maximalen Laktatwert	Je niedriger die Expression, desto niedriger der Laktatwert	Möglicherweise protektiv	nicht signifikant
	Positive Korrelation zum Katecholaminbedarf	Je niedriger die Expression, desto niedriger der Katecholaminbedarf	Möglicherweise protektiv/ Hinweis für einen besseren Verlauf	nicht signifikant
	Korrelation zum Bedarf einer Nierenersatztherapie	Vorhersage des Bedarfs einer Nierenersatztherapie durch 30,9 % des miRNA- Expressionsniveau möglich	Möglicherweise Nutzung als Screening- Parameter für Dialysepflichtigkeit	signifikant, ROC- Analyse durchgeführt
miR-1-3p	Positive Korrelation zum PCT- Wert an Tag 0	Je niedriger die Expression, desto geringer der PCT- Wert an Tag 0	möglicherweise protektiv zu Beginn der Erkrankung	signifikant
	Positive Korrelation zum Interleukon-6 (IL-6) Wert an Tag 0	Je niedriger die Expression, desto geringer der IL-6 Wert an Tag 0	möglicherweise protektiv zu Beginn der Erkrankung	signifikant
	Positive Korrelation zum Katecholaminbedarf	Je niedriger die Expression, desto niedriger der Katecholaminbedarf	Möglicherweise protektiv/ Hinweis für einen besseren Verlauf	nicht signifikant

Tabelle 23. Fortsetzung nächste Seite

miRNA (Expression bei Sepsis- gegenüber Pneumoniepatienten)	Signifikante Korrelation zu Variablen	Schlussfolgerung	Interpretation	Signifikanz in der Regressionsanalyse
miR-95-3p	Positive Korrelation zum Katecholaminbedarf	Je niedriger die Expression, desto niedriger der Katecholaminbedarf	Möglicherweise protektiv/ Hinweis für einen besseren Verlauf	nicht signifikant
miR-1246	Positive Korrelation zur Dauer des Intensivaufenthaltes	Je niedriger die Expression, desto kürzer der Intensivaufenthalt	Möglicherweise protektiv/ Hinweis für einen besseren Verlauf	nicht signifikant

Tabelle 23. Auszug bei Sepsis veränderter miRNAs gegenüber Pneumoniepatienten mit Interpretation. Hier ist nur ein Auszug der in unserer Arbeit signifikant veränderten exprimierten miRNAs zwischen Sepsis- und Pneumoniepatienten. Die Interpretation beruht lediglich auf Schlussfolgerungen und muss in weiteren Studien bestätigt werden. Die genauen Ergebnisse der Berechnungen der Korrelation können in Tabelle 14-Tabelle 18 und die der Regressionsanalyse in Tabelle 19 und Tabelle 20 nachgesehen werden. Die ROC-Analysen sind in Abbildung 25 bis Abbildung 27 nachzusehen. Abk.: CRP: C-reaktives Protein, PCT: Procalcitonin, *Kombinierte Sepsis-Scores: Patienten die gleichzeitig einen SOFA-Score ≥ 10 Punkten, einen APACHE II ≥ 20 und einen MODS ≥ 9 Punkten aufwiesen. Von den 28 Sepsispatienten erfüllten 12 diese Kriterien.

Patientenkohorte und klinischer Verlauf

Im Vergleich zu anderen Studien, die sich ebenfalls mit dem Thema der microRNAs bei Sepsis befasst haben, war unsere Sepsiskohorte älter ($65,11 \pm 13,38$ Jahre) vs. z.B. von Zhao und Li et al. ($56,9 \pm 10,3$ Jahre)¹⁴⁰ bzw. Zhang und Jia et al. ($63,72 \pm 19,83$ Jahre)¹³. Bezogen auf die Krankheitsschwere hatte unsere Kohorte höhere Sepsis-Scores (maximaler SOFA-Score $11,63 \pm 3,27$ Punkte und APACHE-II Score an Tag 0 $23,85 \pm 10,78$ Punkte) vs. Zhao und Li et al. mit einem SOFA-Score von $7,3 \pm 3,2$ Punkte und APACHE-II Score von $16,3 \pm 6,3$ Punkte¹⁴⁰ bzw. Zhang und Li et al. mit einem SOFA-Score von $6,47 \pm 3,11$ Punkten.⁴⁴ Unsere Mortalitätsrate mit 21,4% lag dabei innerhalb der von Fleischmann, Scherag, und Adhikari et al. berichteten globalen Mortalitätsrate.¹³⁸ Ein Erklärungsansatz ist die Rekrutierung der Patienten vor allem aus dem Universitätsklinikum Großhadern, der als Maximalversorger häufig Einweisungen aus kleineren Häusern der Umgebung aufnimmt. So werden auf diesen Intensivstationen schwer erkrankte Patienten behandelt, die in anderen Krankenhäusern möglicherweise bereits austherapiert wurden, was sicherlich mit einem Selektions-Bias verbunden ist.

Patienten mit einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock haben laut einer Studie eine mittlere Intensivstation-Verweildauer von 11 Tagen und einen gesamten Krankenhausaufenthalt von 24 Tagen.¹⁵ Unsere 28 Patienten mit Sepsis kommen auf ähnliche ITS-Aufenthalten, mit einer medianen ITS-Verweildauer von 13 (9-34) Tagen und einem etwas längeren medianen Gesamtaufenthalt im Krankenhaus von 30 (20-44) Tagen. Mit der Dauer des ITS-Aufenthaltes korrelierten die vermehrt exprimierte miR-150-3p (positive Korrelation) und die weniger exprimierte miR-92a-3p und miR-93-5p (jeweils negative Korrelation) und miR-1246 (positive Korrelation). Die miRNAs miR-92a-3p, miR-93-5p und miR-150-3p könnte man ggfs. zur Identifizierung für einen schweren septischen Verlauf heranziehen, während man der miR-1246 eher einen protektiven Effekt zusprechen könnte. Die Regressionsanalyse bestätigte den Zusammenhang lediglich für die miR-150-3p ($p = 0,002$).

Vasilescu und Rossi et al. haben bereits 2009 einen Zusammenhang zwischen einer Sepsis und dem miR-150-Expressionsmuster aufweisen können. Beim Vergleich der Expressionsstärke im Plasma zwischen Sepsispatienten und gesunden Vergleichsprobanden konnten sie zeigen, dass die miR-150 weniger exprimiert wird.¹⁴¹ In unserer Arbeit war die miR-150-3p bei Sepsispatienten bzw. Patienten mit septischen Schock im Vergleich zu Pneumoniepatienten vermehrt exprimiert ($\log_2FC$ 1,04 bzw. 1,19). Beim Vergleich Sepsis bzw. septischer Schock und gesunden Probanden ist kein Expressionsunterschied gemessen worden. In der Arbeit von Vasilescu und Rossi et al. korrelierte die miR-150 mit dem SOFA-Score der Sepsispatienten, was wir jedoch nicht bestätigen konnten ($r_s=0,106$, $p=0,608$). Auch zeigten sie eine Korrelation zwischen der miRNA und den pro-inflammatorischen

Zytokinen IL-10 und -18. In unseren Auswertungen konnten wir keine Korrelation zwischen der miR-150-3p und dem ebenfalls pro-inflammatorischen Zytokin IL-6 zeigen. Interessant in diesem Zusammenhang ist weniger die Funktion der miR-150 als diagnostisches Tool, sondern viel mehr zur Einschätzung der Prognose eines Sepsispatienten. Roderburg et al. konnten keinen signifikanten Unterschied des miR-150-Expressionsniveaus zwischen Sepsispatienten und nicht-Sepsispatienten nachweisen, zeigten jedoch Korrelationen zwischen der miRNA und Nierenfunktionsparametern wie dem Kreatinin und Harnstoff. Außerdem zeigten sie, dass Patienten mit einer niedrigeren miR-150 Expression ein schlechteres klinisches Outcome im Verlauf hatten. Hier sei jedoch erwähnt, dass sie Sepsispatienten als solche mit schwerer Sepsis oder septischen Schock definierten und nicht-Sepsispatienten waren Intensivpatienten, die diese Kriterien nicht erfüllten.¹⁴² Die Korrelation mit Nierenfunktionsparameter konnten wir in unserer (kleineren) Kohorte nicht bestätigen und wir hatten, entgegen Roderburg et al., in unserer Kohorte eine signifikante Korrelation zwischen der miR-150-3p und dem APACHE II-Score ($r_s=0,390$, $p=0,044$), welche jedoch in der Regressionsanalyse nicht bestätigt wurde ($p=0,282$). Den Mangel an einer signifikanten Korrelation zwischen der miR-150 und Entzündungsparametern, wie durch Roderburg et al. gezeigt, konnten wir bestätigen. Interessant ist, dass wir den Nutzen der miR-150-3p als prognostisches Mittel bei Sepsis unterstreichen konnten, indem wir eine signifikante ROC-Analyse mit kombinierten klinischen Sepsis-Scores ermitteln konnten ($AUC= 0,740$, $p = 0,033$). Die miR-150 wurde auch in anderen Themenbereichen untersucht, so zeigte eine Studie mit Mäusen die eine venöse Thrombose hatten, dass durch die Überexpression der miR-150 die Auflösung des Thrombus sowie die Angiogenese beeinflusst werden konnte.¹²³

Die bei Sepsis gegenüber Pneumonie weniger exprimierte miR-93-5p ($\log_2FC -1,10$) und miR-92a-3p ($-1,11$) korrelierte nicht nur negativ mit der Dauer des Intensivaufenthaltes, sondern auch mit der Dauer der Beatmung. Die miR-93-5p war in der Untergruppe der Patienten mit septischen Schock gegenüber Pneumoniepatienten ebenfalls vermindert exprimiert ($\log_2FC -1,02$). Die Korrelation konnte jedoch nicht in der Regressionsanalyse bestätigt werden. Gleichfalls konnten keine der miRNAs eine verlängerte Beatmungsdauer von ≥ 48 Stunden prognostizieren. In weiteren größeren Studien sollten diese Ergebnisse überprüft werden, da es für den Verlauf eines Patienten von Vorteil wäre, wenn man eine verlängerte Beatmungsdauer vorhersagen könnte. Dann könnten prophylaktische Maßnahmen für dessen Komplikationen, wie eine erhöhte 1-Jahres-Mortalität und funktionellen Einschränkungen im Verlauf, frühzeitig eingeleitet werden.⁸³ Mehr als die Hälfte der Sepsispatienten entwickelt eine akute Lungenschädigung (*acute lung injury*, ALI), welche durch eine überschießende intrapulmonale inflammatorische Reaktion auf einen Auslöser gekennzeichnet ist. Diese führt zu einem schweren Verlauf mit erhöhter Mortalität.^{134, 143} Zusammenfassend zeigen beide miRNAs bei verminderter Expression im Rahmen einer Sepsis, einen eher schwereren Verlauf

(u.a. verlängerter Intensivaufenthalt, verlängerte Beatmungsdauer, verlängerter Klinikaufenthalt (nur miR-93-5p) und Korrelation zum Versterben. Angesichts der Sterberate konnten wir zunächst eine Korrelation mit der vermindert exprimierten miR-93-5p zeigen (Eta-Korrelationskoeffizient = 0,403, $p = 0,034$), welche sich in der Regressionsanalyse jedoch nicht bestätigen ließ. Ergänzend zeigte auch die ROC-Analyse kein signifikantes Ergebnis (AUC = 0,750, $p = 0,065$, 95%-KI 0,563 – 0,937). In der Literatur gibt es Arbeitsgruppen die sowohl eine verminderte als auch erhöhte Expression der miR-93-5p bei Sepsis nachgewiesen haben.^{144, 145} Die Ergebnisse werden jedoch sicherlich von Zeitpunkt der Bestimmung, der Probe (u.a. frei zirkulierende oder Zell-miRNA), sowie möglicherweise bereits begonnene Therapien beeinflusst. So wurden bei unseren Patienten die Blutentnahmen unter anderem ab dem ersten Tag der Diagnose durchgeführt, wobei bereits z.B. antibiotische oder steroid-basierte Therapien begonnen wurden. Liu und Peng et al. haben in einer in-vitro ausgelösten akuten Lungenschädigung (ALI) in Rattenzellen gezeigt, dass die Expression der miR-92a-3p in alveolaren Epithelzellen vermindert ist, während die freigesetzten Exosomen eine vermehrte Expression zeigten. Zusätzlich konnten sie bestätigen, dass die miR-92a-3p eine wichtige Funktion bei der Entstehung der Lungenschädigung hat.¹⁴³ Eine andere Studie hat gezeigt, dass die miR-92a-3p und miR-93-5p bei Patienten mit einer neu diagnostizierten primären Immunthrombozytopenie (≤ 3 Monaten) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe in beiden Fällen eine vermehrte Expression gezeigt haben. Beide haben unter anderem das CD69 als Zielgen, welches mit Autoimmunerkrankungen assoziiert wurde.¹⁴⁶

Die antiinfektive Therapie ist einer der Hauptbestandteile der Sepsistherapie, weswegen ein frühzeitiger und kalkulierter Beginn auch in der ersten Stunden nach Vorstellung des Patienten eingeleitet werden sollte.²⁶ Leider zeigten keine der signifikant regulierten miRNAs bei Sepsispatienten eine Korrelation mit der Dauer der Antibiotikatherapie und es konnte auch kein Nutzen der miRNAs als Biomarker zur Identifizierung von Patienten mit einer verlängerten Therapie > 10 Tage nachgewiesen werden.

Wir untersuchten die Möglichkeit der miRNAs als Biomarker zur Einschätzung der Schwere der Erkrankung durch Kombination verschiedener Sepsis-Scores. Dafür untersuchten wir die Patienten, die gleichzeitig an Tag 0 einen SOFA-Score ≥ 10 Punkten (Sterberate schätzungsweise $\geq 40\%$)^{17, 147}, einen APACHE II ≥ 20 (Krankenhaussterberate bei nicht chirurgischen Patienten von $\geq 40\%$)¹⁴⁸ und einen MODS ≥ 9 Punkten (Krankenhaussterberate von $\geq 50\%$)²² aufwiesen. Hierbei zeigten wir zunächst eine signifikante positive Korrelation zwischen den kombinierten Sepsis-Scores und der vermehrt exprimierten miR-4446-3p ($p = 0,049$) sowie der miR-150-3p ($p = 0,019$) und eine negative Korrelation zu der weniger exprimierten miR-192-5p ($p = 0,049$). Für die beiden erstgenannten bedeutet dies, je höher die Expression, desto höher die Sepsis-Scores und für die miR-192-5p heißt es, je niedriger die Expression, desto höher die Scores. In der Regressionsanalyse konnte dieser

Zusammenhang jedoch nicht bestätigt werden. Wir haben dennoch eine Receiver Operating Characteristic - Analyse (ROC) durchgeführt, welche für die miR-150-3p und miR-4446-3p einzeln sowie in Kombination akzeptable Ergebnisse lieferte (beide miRNAs zusammen: AUC=0,744, 95%KI= 0,557 – 0,932, p=0,032). Hier ist vor allem interessant, dass die Kombination aus beiden ein besseres Ergebnis liefert, als die beiden miRNAs einzeln betrachtet (miR-150-3p: AUC=0,740, p=0,033 und miR-4446-3p: AUC=0,719, p=0,051). Die Kombination beider miRNAs kann also mit einer Sensitivität von 83,3% und einer Spezifität von 60% Patienten mit oben genannten kombinierten Sepsis-Scores, von solchen die die Höhe der Scores nicht erreichen, anhand des miRNA-Expressionsniveaus unterscheiden (Vergleich Abbildung 27). Fayyad-Kazan und EIDirani et al. konnten bei der Untersuchung des miRNA-Expressionsmuster von sechs Patienten mit einer humanen T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1) – Infektion ebenfalls feststellen, dass die Kombination von vier miRNAs (miR-29c, -30c, -193a-5p und -885-5p) bessere Ergebnisse in der ROC- bzw. AUC-Analyse lieferte, als die einzelnen miRNAs.¹²⁹ Zhao et. al haben ebenfalls bei der Untersuchung der early-onset-Sepsis bei Neugeborenen (Infektion innerhalb der ersten 72 Lebensstunden) eine verbesserte AUC, Sensitivität und Spezifität erreichen können bei der Untersuchung eines miRNA-Panels von 3 miRNA im Vergleich zu den einzelnen: die miRNAs miR-15a-5p, miR-223-3p und miR-16-5p konnten Patienten mit Sepsis mit einer AUC von 0,85 (95%-KI: 0,77 - 0,95, p < 0,001), einer Sensitivität von 74,6% und Spezifität von 86% identifizieren.¹⁴⁹ Bei der Interpretation dieser Ergebnisse, müssen einige Aspekte bedacht werden. Zunächst sollte beachtet werden, dass laut Knaus et al. der APACHE II Score an Tag 0 nicht am besten geeignet ist, um die Mortalitätsrate zu prognostizieren.²⁰ Des Weiteren sind bei Patienten mit Schock verschiedener Ätiologien sowohl der SOFA-Score als auch der MODS gering bessere Prädiktoren der Mortalität als der APACHE II.¹⁸ Durch die Kombination aller Scores, haben wir uns die Vorteile der einzelnen zu Nutze gemacht. Klinische Scores sind schnell prä- und innerklinisch anwendbar und leicht zu interpretieren. Je höher der Wert, desto schlechter ist der klinische Zustand des Patienten. Doch lassen sich diese nur bei Vorhandensein aller Werte bestimmen, die gerade bei Beginn einer Sepsis außerhalb von Intensivstationen nicht routinemäßig bestimmt werden (z. B. PaO₂) und die Cut-off Werte wurden lediglich per Konsens beschlossen.¹¹ Als weiteren wichtigen Punkt haben wir, wie andere Arbeitsgruppen auch, bei Fehlen eines Wertes mit dem Mittelwert aus dem Tag vorher und nachher gerechnet oder wenn dieser an nur einem der Tage bestimmt worden ist, diesen verwendet.^{17, 18, 75} Das schließt also nicht aus, dass manche Werte bzw. im Folgeschluss Scores, den tatsächlichen Wert über- oder unterschätzt haben. Zu beachten ist außerdem, dass in dem 1985 veröffentlichten Paper von Knaus und Draper et al. darauf hingewiesen wird, dass für die Berechnung des APACHE II Scores, bzw. für den APS-Teil, die benötigten 12 Parameter vom Patienten tatsächlich gemessen werden müssen und es für eine ausreichende Aussagekraft

nicht zulässig ist, nicht gemessene Variablen durch die Annahme von Normwerten zu ersetzen.²⁰ Dies wurde beispielsweise bei der Etablierung des MODS gemacht.²² Als Letztes sollte hinsichtlich des MODS erwähnt werden, dass wir obwohl anders empfohlen, nicht den jeweiligen ersten Wert des Tages, sondern den jeweils schlechtesten Wert verwendet haben.²² Dies erfolgte, ähnlich wie es beim APACHE-II der Fall ist, zur möglichst besseren Visualisierung der Schwere der Beeinträchtigung der Patienten.

Ein möglicher klinischer Nutzen durch unsere Ergebnisse wäre, wenn bei Aufnahme von Patienten das miRNA-Expressionsniveau der miR-4446-3p und miR-150-3p bestimmt werden würde und so eine Einschätzung der Schwere der Erkrankung möglich sei. Bei einer vermehrten Expression ist von einem erhöhten kombinierten klinischen Score auszugehen und somit mit einem schwereren Verlauf zu rechnen. Zur Validierung dieser Hypothese sind jedoch weitere größere klinische Studien nötig und es müsste eine flächendeckende miRNA-Messung etabliert werden. In der Literatur findet man zur miR-4446-3p Studien zu unterschiedlichsten Krankheitsentitäten und zur Schwangerschaft, jedoch keine Arbeit die die miRNA im Rahmen einer Sepsis untersucht hat. Eine Arbeit von Kim und Kang et al. beschreibt die vermehrte Expression der miR-4446-3p in Brustkrebszellen nach mechanischer Kompression. Es wird ein Zusammenhang zwischen dem Tumorwachstum /-progression und der Expressionsstärke vermutet.¹⁵⁰ Lutsenko und Belaya et al. zeigten, dass im Vergleich zu gesunden Probanden die miR-4446-3p bei Akromegalie im Blut vermindert exprimiert wird.¹²⁸ Im Bereich der Exosomenforschung zeigen Menon und Denath et al. unter anderem, dass die exosomale miR-4446-3p im Verlauf einer Schwangerschaft ihr Expressionsniveau ändert.¹⁵¹ Wir haben in unserer Studie erstmals einen Zusammenhang zwischen der miR-4446-3p und der Sepsis zeigen können und diese als möglichen Biomarker bei der Einschätzung der Schwere evaluiert.

Der septische Schock ist die schwerste Form einer Sepsis, die durch eine Störung des Kreislaufs und verschiedener Zellfunktionen geprägt ist. Für die Definition ist eine Erhöhung des Laktats > 2mmol/l sowie der Gebrauch von vasoaktiven Substanzen, trotz adäquater Volumentherapie, um einen mittleren arteriellen Druck von > 65 mmHg aufrecht zu erhalten notwendig.¹¹ In unserer Sepsiskohorte wurde an Tag 0 der höchste Laktatwert von 2,65 (IQR=1,6-4,12) mmol/l gemessen und der Normbereich (0,5-1,6 mmol/l) wurde an Tag 4 (1,4 (IQR=1,2-1,7) mmol/l) erreicht. Der maximale Laktatwert korrelierte positiv mit vier miRNAs: miR-378i, miR-378a-3p, miR-500a-3p und miR-511-5p. Dabei werden all diese miRNAs bei Sepsis vermindert exprimiert und eine positive Korrelation bedeutet, dass eine verminderte Expression mit einem geringeren Laktatwert korreliert. Der Katecholaminbedarf korreliert positiv mit fünf vermindert exprimierten miRNAs: miR-1-3p, miR-95-3p, miR-500a-3p, miR-501-3p und miR-660-5p. Eine verminderte Expression ist mit einem geringeren Katecholaminbedarf und somit mit einem besseren Verlauf assoziiert. In der

Regressionsanalyse konnte der Zusammenhang des Laktatwert nur mit der miR-378a-3p und der Katecholaminbedarf mit der miR-660-5p bestätigt werden (s. Tabelle 18). Wang et al. haben die miR-378a-3p in einer Sepsiskohorte untersucht und eine signifikant höhere Expression bei Sepsispatienten gegenüber gesunden Probanden vermessen, sowie eine positive Korrelation zu Inflammationsmarkern wie das IL-6 zeigen können. In einer in vivo Untersuchung bei Ratten, konnten sie einen Zusammenhang zwischen der miR-378a-3p und der kardialen Dysfunktion bei Sepsis aufweisen.¹⁵² Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu unseren, bei der die vermindert exprimierte miR-378a-3p durch die positive Korrelation zum Laktatwert, einen eher positiveren Verlauf beschreibt. Caserta und Kern et al. haben ebenfalls eine verminderte Expression der miR-378a-3p bei Patienten mit schwerer Sepsis gegenüber Patienten einem schweren nicht-infektiösem SIRS (systemic inflammatory response Syndrome) zeigen können.¹⁵³

Die vermindert exprimierte miR-660-5p (log2FC -1,13) zeigte bei uns eine signifikante positive Korrelation zum Katecholaminbedarf und Kreatinin-Wert an Tag 0. Dies zeigt einen möglicherweise besseren klinischen Verlauf, da der Patient einen geringeren Katecholaminbedarf aufweist und weniger Nierenschädigung mit konsekutivem Anstieg der Retentionsparameter präsentiert. In der Literatur findet man lediglich einen Zusammenhang zwischen der miR-660 und Karzinomen wie dem Lungenkarzinom.¹⁵⁴ Wir haben ein signifikant verändertes Expressionsmuster bei Sepsispatienten gegenüber Pneumoniepatienten zeigen können, welches bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde.

Das in Erythrozyten gebundene Hämoglobin (Hb) ist u.a. für den Sauerstofftransport ins Gewebe und in die Organe nötig. Im Rahmen einer Sepsis können inflammatorische Mediatoren zu einer Anämie führen, in dem u.a. die Erythropoese gestört oder die Lebensdauer der Erythrozyten verkürzt wird. Bei einem verminderten Hämoglobin kann es zu einer Sauerstofftransportstörung kommen mit einer zum Teil schwerwiegenden Hypoxie in verschiedenen Geweben. Freies Hämoglobin kann wiederum freie Radikale bilden und so zu einer weiteren inflammatorischen Reaktion führen mit konsekutiven Schädigungen von z.B. Endothelzellen. Ein Abfall des Hb-Wertes von $\geq 7\%$ am vierten Tag nach Aufnahme ist mit einer erhöhten Langzeitmortalität verbunden. Des Weiteren ist ein gemessener Hb-Wert von < 8 g/dl in den ersten 48 Stunden nach Aufnahme mit einer erhöhten Mortalität bei Sepsispatienten assoziiert.⁷⁹ Die bei unserer Sepsiskohorte verminderten miRNAs miR-18a-3p, miR-511-5p und miR-660-5p haben jeweils eine Korrelation zum Hb-Wert gezeigt. Erstgenannte zeigte eine positive Korrelation ($r_s=0,405$, $p=0,033$) und die beiden letztgenannten eine negative Korrelation (miR-511-3p: $r_s=-0,473$, $p=0,011$, miR-660-5p: $r_s=-0,477$, $p=0,010$). Leider konnte keine der Korrelationen in der Regressionsanalyse bestätigt werden. Die miR-511-5p zeigte jedoch auch eine positive Korrelation zum Laktatwert. Je niedriger die miRNA exprimiert wird, desto höher ist der Hb-Wert und desto niedriger der

Laktatwert. Die miR-660-5p zeigte ebenfalls eine positive Korrelation zum Katecholaminbedarf. Je niedriger also die miR-660-5p exprimiert wird, desto höher ist der Hb-Wert und desto geringer ist der Katecholaminbedarf (siehe auch Abschnitt Patientenkohorte und klinischer Verlauf weiter oben). Zusammenfassend können die miRNA miR-511-5p und miR-660-5p mit einem, womöglich besseren, Verlauf der Sepsis in Zusammenhang gebracht werden. Curtale und Renzi et al. haben gezeigt, dass bei Überexpression der miR-511-5p die unkontrollierte Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen nach Re-Exposition von Lipopolysacchariden in humanen Monozyten gebremst werden kann. Dies führt zu einer sogenannten Endotoxin-Toleranz und schützt die Zelle bzw. den Organismus vor einer Selbstschädigung.³⁹ Möglicherweise zeigen unsere Ergebnisse, dass eine Sepsis zu einer verminderten Expression von miR-511-5p führen kann und so die Autoregulation des Immunsystems gestört wird. Beim Vergleich von Sepsispatienten gegenüber gesunden Probanden (log2FC -2,13) bzw. Pneumoniepatienten (log2FC -1,54) ist die miR-511-5p jeweils weniger exprimiert. Da eine miRNA hunderte von verschiedenen Genen beeinflussen kann, sind sowohl krankheitsauslösende wie auch positive Effekte auf den Krankheitsverlauf möglich.¹⁵⁵

Infektionsparameter

Es gibt verschiedene etablierte serologische Entzündungsparameter für die Identifizierung des Krankheitsbilds einer Sepsis: Leukozyten, das C-reaktive Protein (CRP), das Procalcitonin (PCT) und das Interleukin-6.^{9, 35, 47, 155}

Eine Veränderung der Leukozytenzahl weist auf eine Infektion hin, ist jedoch nicht sehr spezifisch und unterliegt in der Aussagekraft dem CRP. In Kombination mit einer CRP-Erhöhung (> 40 mg/l) oder Fieber (38,5 °C) zeigt sie jedoch eine gute Spezifität für eine bakterielle Infektion. Bei Sepsis kann es sowohl zu einer Veränderung der Leukozytenzahl als auch der Morphologie kommen.^{9, 74} In unserer Studienkohorte wurde ein Leukozytenmaximum an Tag 0 (14,6 G/l (IQR = 8,2-18,6)) und Tag 10 (14,6 G/l (IQR = 10,1-19,5)) mit Erreichen des laborinternen Normbereiches an Tag 14 (9,4 G/l (IQR = 7,4-17,4)) beobachtet. Der Abfall der Leukozytenzahl kann durch das Anschlagen der Therapiemaßnahmen bedingt sein. Die Leukozytenzahl an Tag 0 zeigte eine negative Korrelation, mit der bei Sepsis im Vergleich zu Pneumonie weniger exprimierten, miR-192-5p ($p = 0,044$). Das bedeutet, je niedriger die miRNA exprimiert wird, desto höher ist die Leukozytenzahl. Dieser Zusammenhang konnte in der Regressionsanalyse nicht bestätigt werden. Mit der weiter oben beschriebenen Korrelation der miR-192-5p mit den kombinierten Sepsis-Scores, scheint diese miRNA bei verminderter Expression mit einem schweren Sepsisverlauf assoziiert zu sein. Caserta et al. haben die miR-192-5p ebenfalls in Zusammenhang mit Sepsis untersucht. Sie haben gezeigt, dass bei einer schweren Sepsis im Vergleich zu einem schweren nicht-infektiösen SIRS die miR-192-5p weniger exprimiert wird und negativ mit den Entzündungsparametern CRP und IL-6 korreliert.

Außerdem haben sie gezeigt, dass das Expressionsniveau verschiedener miRNAs besser zwischen den beiden Krankheitsentitäten unterscheiden konnte, als das herkömmlich genutzte PCT und CRP.¹⁵³

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein Akut-Phase-Protein, welches bei einer Entzündungsreaktion oder bei Gewebeschaden erhöht sein kann. Im Rahmen einer Sepsis korreliert es mit der Schwere der Erkrankung, zeigt jedoch nur eine geringe Spezifität.^{9, 47} Ein Anstieg des CRPs kann schon nach 4-6 Stunden nach Stimulus beobachtet werden und zeigt ein Maximum nach 36-50 Stunden.⁹ In unserer Studie zeigte das CRP ein Maximum von 23,5 (IQR=16,7-32,5) mg/dl an Tag 1 und danach einen stetigen Abfall, jedoch ohne Erreichen des Normbereiches ($\leq 0,5$ mg/dl) innerhalb der beobachteten 21 Tage. Es gab eine negative Korrelation zwischen der vermehrt exprimierten miR-1228-5p (log2FC 4,7) und dem CRP-Wert ($r_s=-0,494$, $p=0,009$), sprich je höher die Expression, desto niedriger der Entzündungswert. Dies konnte in der Regressionsanalyse nicht bestätigt werden. Es wurde ebenfalls eine negative Korrelation zwischen der miR-1228-5p und dem PCT-Wert gezeigt ($r_s=-0,394$, $p=0,038$), welche ebenso in der Regressionsanalyse nicht bestätigt werden konnte. Trotzdem scheint die miR-1228-5p bei vermehrter Expression mit einer geringen Erhöhung der Entzündungswerte an Tag 0 assoziiert zu sein und so einen eher positiven Effekt auf die Krankheitsschwere haben könnte. Hierbei ist jedoch der weitere Verlauf der Entzündungsparameter mit den Höchstwerten und der Halbwertszeit zu beachten. In der Literatur wurde dieser Zusammenhang noch nicht beschrieben.

Das PCT ist ein Prohormon des Calcitonins und wird vor allem bei bakterieller Infektion vermehrt gebildet. So ist der Nachweis eines erhöhten PCTs Hinweis auf eine bakterielle Infektion. Ein Maximum ist meist nach 6-8 Stunden nach Infektion erreicht und sinkt beispielsweise bei erfolgreicher Therapie.⁹ Außerdem korrelierte die Höhe des PCT bei Aufnahme auf die Intensivstation mit der Progression von einer schweren Sepsis zu einem septischen Schock und korreliert mit einer Bakteriämie.^{9, 47} Dies macht ihn zu einem sehr dynamischen, schnell reagierenden Parameter und erklärt den zunächst leichten Anstieg zwischen Tag 0 (4,7 ng/ml) und Tag 1 (5,0 ng/ml) und dem danach folgenden starken Abfall zu Tag 4 (0,96 (0,29-2,29) ng/ml) durch Wirkung der therapeutischen Maßnahmen. Das PCT an Tag 0 korrelierte mit folgenden miRNAs: positiv mit der vermindert exprimierten miR-1-3p und negativ mit den vermehrt exprimierten miRNAs miR-1228-5p, -4433b-3p und -150-3p. Allen gemeinsam ist eher ein positiver Effekt: je weniger bzw. je mehr die miRNA exprimiert wird, desto niedriger ist der PCT-Wert. Dieser Zusammenhang konnte lediglich für die miR-1-3p in der Regressionsanalyse bestätigt werden ($p<0,001$). Interessanterweise, korreliert die miR-1-3p auch positiv mit dem Zytokin IL-6 ($p=0,034$), welches ebenfalls in der Regressionsanalyse bestätigt wurde. Das Zytokin IL-6, fällt in unserer Studie innerhalb der ersten 21 Tage nach Studieneinschluss, jedoch ohne Erreichen des laborinternen

Normbereiches von $\leq 5,9$ pg/ml (s. Abbildung 16). Die miR-1-3p scheint also mit zwei Entzündungsparameter assoziiert zu sein, in beiden Fällen zeigt eine verminderte Expression auch einen reduzierten PCT bzw. IL-6 Wert und beide Werte sind signifikant verändert bei Infektion gegenüber keiner Infektion.⁴⁷ Zwar zeigen Studien, dass das IL-6 als Biomarker der Sepsis weniger bedeutsam ist als das CRP oder PCT, jedoch ist ein konstant erhöhter IL-6-Spiegel mit einem Multiorganversagen und Mortalität assoziiert.⁹ In der Literatur haben Gao, und Yu et al., anders als bei uns, eine vermehrte Expression der miR-1-3p bei septischen Mäusen sowie bei einer kleinen Anzahl an Sepsispatienten gegenüber gesunden Probanden (jeweils drei Teilnehmer) beobachtet. Sie konnten der miR-1-3p einen pro-apoptotischen und pro-inflammatorischen Effekt zusprechen. Es wurde zudem eine Erhöhung bzw. Störung der Zellpermeabilität beobachtet. Dies kann zu einer akuten Lungenschädigung (*acute lung injury*, ALI) z.B. bei Sepsis führen.¹⁵⁶ Eine andere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass eine mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren supplementierte Endothelzelle bei Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie dem IL-1 β , IL- γ und TNF α , im Vergleich zu Kontrollzellen, eine 118-fache vermehrte Expression der miR-1-3p zeigt. Sie könnte demnach durch Zytokine beeinflusst werden oder diese beispielsweise über den Jak-STAT Signalweg sogar beeinflussen.¹³⁶ Zhao et al. haben eine vermehrte Expression der miRNA-1-3p bei Neugeborenen mit early-onset-Sepsis (EOS), also einer Sepsis innerhalb der ersten 72 Lebensstunden, im Vergleich zu gesunden Neugeborenen nachgewiesen. Diese konnte auch mit einer AUC von 0,69 (95%-KI= 0,58-0,79, $p < 0,01$) und einer Sensitivität von 86% und Spezifität von 57,6% Patienten unterscheiden.¹⁴⁹ Zwar zeigen diese Studien im Vergleich zu unseren Ergebnissen, eine vermehrte Expression der miRNA-1-3p bei Infektion oder Aussetzung von Zytokinen, sie unterstreichen aber den Zusammenhang der miRNA mit einer entzündlichen bzw. inflammatorischen Stoffwechsellage, wie sie bei Sepsis vorzufinden ist. MiRNAs haben nachweislich einen Einfluss auf die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen im Rahmen einer Entzündungsreaktion.¹⁵⁵ Caserta et al. haben ebenfalls postuliert, dass zirkulierende miRNAs einen eindämmenden Effekt auf eine inflammatorische Reaktion haben könnten.^{153, 157} Weitere, größer angelegte Studien, müssen den genauen Zusammenhang untersuchen.

Gerinnung

Im Rahmen eines Intensivaufenthaltes mit Sepsis kann es zu einer Veränderung der Blutgerinnung kommen und somit zu einem erhöhtem Risiko für Blutungen und Thrombosen.¹² Gerade in Hinblick auf die gefürchtete Komplikation einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC), bedarf sie immer einer gesonderte Begutachtung. Bei der DIC kommt es zu einer Dysregulation von pro- und antithrombotischen Faktoren, zum Verbrauch von

Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten und letztlich können mikro- und makrovaskuläre Thrombosen zu einem Multiorganversagen führen. Dabei steigt die Mortalität von Sepsispatienten deutlich, wenn sich eine DIC entwickelt.^{158, 159} Es gibt keinen einzelnen Laborwert der zur Diagnose einer disseminierten intravasalen Gerinnungsstörung führt, sondern vielmehr die Kombination aus klinischem Patientenzustand und veränderten Gerinnungsparametern wie der Thrombozytenzahl, Hämatokrit, Fibrinogen, D-Dimere oder einer verlängerten aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT), sollte das behandelnde Team aufmerksam werden lassen. Es gibt einen DIC-Score, der sowohl die klinische Wahrscheinlichkeit als auch Laborparameter mit einbezieht und bei der Diagnose einer DIC helfen kann.^{158, 160}

In unserer Arbeit sind einige verändert exprimierte miRNAs zwischen Pneumonie- und Sepsispatienten aufgefallen, die mit Parametern der Gerinnung (Thrombozyten und aPTT) korrelierten. Thrombozyten sind nicht nur ein wichtiger Bestandteil der Gerinnung, sondern generieren einen großen Anteil an Exosomen im Plasma und können direkten Einfluss auf die Immunreaktion des Körpers haben.¹⁶¹ Die Thrombozytenzahl hatte eine negative Korrelation mit den bei Sepsispatienten vermindert exprimierten miRNAs miR-200c-3p ($r_s = -0,425$, $p = 0,024$) und miR-501-3p ($r_s = -0,474$, $p = 0,011$). Dieser Zusammenhang konnte für die miR-501-3p (log2FC -1,17) in der Regressionsanalyse bestätigt werden ($p=0,022$). Je niedriger die Expression der miRNA gemessen wurde, desto höher war die Thrombozytenzahl an Tag 0 bei diesem Patienten. Eine Thrombozytopenie kann in 98% der Patienten mit DIC gemessen werden, wobei bis zu 50% eine Thrombozytenzahl unter $50 \times 10^9/l$ aufweisen.¹⁶⁰ In der Literatur konnte die miRNA-501-3p in gelagerten Thrombozytenkonzentraten nachgewiesen werden und im Vergleich zum ersten Tag wurde die miRNA an den Tagen 2-7 runterreguliert, bzw. weniger exprimiert (log2FC bis zu -3,12). Thrombozyten degradieren bei Lagerung und zeigen einen Verlust der physiologischen Funktion.¹²⁰ Es ist zu beachten, dass die Sepsiskohorte an Tag 0 durchschnittlich normale Thrombozytenzahlen zeigte (Mittelwert $247 \times 10^3/\mu l$ bzw. Median $221 \times 10^3/\mu L$ (siehe auch Tabelle 4) und lediglich 8 von 28 Sepsispatienten Thrombozytenzahlen von unter $150 \times 10^3/\mu l$ aufwiesen. Davon zeigten zwei Patienten Werte von unter $50 \times 10^3/\mu L$. Eine (schwere) Thrombozytopenie kann jedoch auch im späteren Sepsisverlauf auftreten, weshalb eine Untersuchung der Entwicklung der Thrombozytenzahl und die Expressionsveränderung der miRNA interessant wäre.

Eine verlängerte aPTT kann Hinweis auf eine gestörte Gerinnung sein, tritt aber auch unter einer Heparintherapie auf. In bis zu 50-60% der Patienten mit DIC kann eine verlängerte aPTT gemessen werden.¹⁶⁰ Die aPTT ist ein Laborparameter zur Evaluierung der intrinsischen Gerinnungskaskade mit u.a. den Gerinnungsfaktoren VIII, IX, XI und XII, sowie der gemeinsamen Endstrecke und dem Gerinnungsfaktor X.¹²¹ In unserer Studie zeigte die bei Sepsis gegenüber Pneumonie vermindert exprimierte miRNA-200c-3p (log2FC -1,66) eine

positive Korrelation zur gemessenen aPTT ($r_s=0,424$, $p=0,024$), was in der Regressionsanalyse jedoch nicht bestätigt werden konnte. Man könnte jedoch interpretieren, dass eine verminderte Expression mit einer kürzeren aPTT in Zusammenhang steht und somit mit einer weniger gestörten Gerinnung. Allerdings zeigen wie oben bereits erwähnt nur bis zu 50-60% der Patienten mit einer DIC eine veränderte aPTT und andere Faktoren wie eine Thromboseprophylaxe mit Heparin können die Werte beeinflussen. Qian und Yan et al. haben das miRNA-Expressionsmuster bei Patienten mit einer neu diagnostizierten primären Immunthrombozytopenie (≤ 3 Monaten) untersucht und haben erhöhte Expressionsniveaus der miR-200c-3p im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt. Des Weiteren stieg der Expressionsunterschied bei Patienten, die eine chronische Immunthrombozytopenie (≥ 12 Monate) hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur neu diagnostizierten Gruppe.¹⁴⁶ Zuvor wurde die miRNA vor allem bei Karzinomen untersucht (z.B. Brust- und Magenkrebs).¹⁴⁶ Bei der Interpretation der Rolle der miRNA miR-200c-3p in der Gerinnungskaskade, gibt es viele Faktoren, die beachtet werden müssen. Dennoch hat die miRNA-200c-3p sowohl einen Zusammenhang mit der Thrombozytenzahl als auch mit der aPTT gezeigt, was zumindest eine mögliche Rolle der miRNA in der Gerinnung vermuten lässt. Liu und Du et al. haben gezeigt, dass die miR-200c-3p im Plasma von schweren Pneumoniepatienten gegenüber Gesunden vermehrt exprimiert wird. Bei Hemmung dieser in einem Zellmodell, konnte eine geringere Influenza-induzierte Lungenschädigung beobachtet werden.¹⁶² Bei unserer Sepsiskohorte war die miRNA zwar vermindert exprimiert, dies unterstützt aber unsere Theorie, dass eine verminderte miR-200c-3p Expression mit einem besseren Verlauf assoziiert sein könnte.

Lediglich die bei Sepsispatienten vermindert exprimierte miR-501-3p zeigte eine, in der Regressionsanalyse bestätigte, signifikante negative Korrelation zur der Thrombozytenzahl. Wang und Wang et al. haben zum Beispiel bei einer Gruppe von Sepsispatienten mit einer gestörten Gerinnung (SIC) gegenüber Patienten mit einer Sepsis ohne Gerinnungsstörung, die vermindert exprimierte Plasma-miR-92a-3p untersucht. Diese konnte mit einer AUC von 0,660 ($p=0,011$, 95%-KI 0,537-0,782) eine gestörte Gerinnung ausschließen.¹⁵⁹ Sie haben somit erste Ergebnisse erbracht, dass das miRNA-Expressionsmuster gefährdete Sepsispatienten identifizieren könnte. Das Thema der gestörten Blutgerinnung in Zusammenhang mit microRNAs sollte in weiteren Studien untersucht werden, da Sepsispatienten von einer frühzeitigen Behandlung profitieren könnten.

Nierenfunktion

Das Auftreten eines akuten Nierenversagens (bzw. einer „acute kidney injury“ (AKI)) ist, bei uns gemäß KDIGO Definition, das Eintreten von einem Anstieg des Serumkreatinin um $\geq 0,3\text{mg/dl}$ ($\geq 26,5\text{ }\mu\text{mol/l}$) innerhalb von 48 Stunden oder einem Anstieg des Serumkreatinin um das $\geq 1,5$ -fach des Ausgangswertes, welches nachgewiesen oder angenommen innerhalb der

letzten 7 Tagen aufgetreten ist oder eine Urinausscheidung $< 0,5\text{ml/kg Körpergewicht/h}$ für mindestens 6 Stunden.²⁵ Es kann durch eine Sepsis induziert werden und ist mit einem schlechteren Outcome assoziiert.^{23, 145} Die Sepsis ist einer der Hauptursachen für die Entstehung einer akuten Nierenschädigung (AKI) bei kritisch kranken Patienten und kann in 47,9% von Intensivpatienten diagnostiziert werden. Dabei erhöht die AKI die Mortalität bei Sepsispatienten gegenüber solchen die kein Nierenversagen entwickeln (34% vs. 7%).²³ Lui et al. werteten 47 Studien aus und fanden u. a. folgende Risikofaktoren für das Auftreten einer AKI: Komorbiditäten wie Bluthochdruck und Diabetes Mellitus, eine pulmonale Infektion, das Auftreten eines septischen Schocks und Therapiemaßnahmen wie der Einsatz von Vasopressoren, sowie eine künstliche Beatmung.¹⁶³

Unsere Auswertungen ergaben, dass die bei Sepsis vermehrt exprimierte miR-370-3p negativ mit dem Kreatininwert korreliert ($p=0,03$), die weniger exprimierte miR-660-5p positiv mit dem Kreatininwert korreliert ($p=0,046$) und die vermehrt exprimierte miR-1228-5p mit dem Harnstoffwert negativ korreliert ($p=0,002$). In der Regressionsanalyse konnte dieser Zusammenhang für die miR-660-5p und miR-1228-5p bestätigt werden. Das bedeutet, je weniger die miR-660-5p exprimiert wird, desto geringer ist der Kreatininwert. Je höher die miR-1228-5p exprimiert wird, desto geringer ist der Harnstoff an Tag 0. Beide Zusammenhänge weisen auf eine geringere Nierenschädigung an Tag 0 hin, denn u.a. ist ein Anstieg des Harnstoffs Zeichen einer reduzierten Nierenfunktion.⁸⁰ Ge und Huang et al. haben beim Vergleich von Sepsispatienten mit AKI im Vergleich zu Sepsispatienten ohne AKI festgestellt, dass u.a. die miRNA-1228-3p weniger exprimiert wird.²³ In unserer Studienkohorte wurde die miR-1228-5p bei Sepsispatienten gegenüber Pneumoniepatienten deutlich vermehrt exprimiert ($\log_2\text{FC } 4,7$). Beim Vergleich von Sepsispatienten ($\log_2\text{FC } 3,27$) sowie Patienten mit septischen Schock ($\log_2\text{FC } 4,08$) gegenüber gesunden Probanden, haben wir ebenfalls eine vermehrte Expression festgestellt. Die Arbeit von Ge und Huang et al. zeigt, dass eine verminderte Expression mit einer AKI vergesellschaftet sein kann. Dies unterstützt die Hypothese, dass eine erhöhte Expression mit einer besseren Nierenfunktion assoziiert sein könnte. In Zusammenschau unserer Ergebnisse der miRNA-1228-5p mit den negativen Korrelationen zu den Entzündungsparametern Procalcitonin und CRP (s. oben) sowie dem Harnstoff, zeigt es in unserer Studienkohorte eher einen protektiven Effekt zu haben. Dies wird durch die Studie von Li und Ding et al. unterstützt: Sie haben in einer in-vitro Untersuchung gezeigt, dass die microRNA-1228-5p durch die Exposition von Feinstaub in menschlichen Lungenadenokarzinom Zellen (A549) runterreguliert wird. Die miRNA-1228-5p hat als Zielgene einige, die bei einer Zellapoptose involviert sind. Bei verminderter Expression kommt es vermehrt zur Zellapoptose. Wird die miRNA jedoch hochreguliert kommt es nicht nur zu weniger Zelltod, sondern es können Zellschäden, die durch Feinstaub induziert worden sind, teilweise rückgängig gemacht werden.¹⁶⁴ Zhong und Wu et al. haben festgestellt, dass die

miR-1228-5p bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt, also einem akuten Zelluntergang, vermindert exprimiert wird.¹⁶⁵ Man kann diese Ergebnisse nicht direkt mit unseren vergleichen. Die bioinformatische Analyse der miRNA-1228-5p legt jedoch nahe, dass sie zellprotektive Stoffwechselwege unterstützt.

Das Auftreten einer AKI korreliert signifikant mit der vermehrt exprimierten miRNA let-7e-5p ($p=0,004$), sowie mit der weniger exprimierten miR-501-3p ($p=0,026$). Nur die let-7e-5p konnte in der Regressionsanalyse bestätigt werden. Je höher das Expressionsniveau der miRNA let-7e-5p ist, desto weniger wahrscheinlich ist das Auftreten einer AKI. Wir haben in einer ROC-Analyse untersucht, ob man das Expressionsniveau der let-7e-5p als Biomarker für das Auftreten eines akuten Nierenversagens heranziehen könnte. Mit einer AUC von 0,769 ($p=0,016$), einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 62% konnten wir gute Ergebnisse aufweisen, jedoch hatten wir nur eine kleine Anzahl an Patienten. Diese Ergebnisse müssten in größer angelegten Studien bestätigt werden. Es gibt kaum Studien, die die let-7e-5p bei Sepsispatienten untersucht haben. Poore und Ko et al. haben in Vollblut von Patienten mit einer bakteriellen Pneumonie mit *Streptococcus pneumoniae* gegenüber Gesunden gezeigt, dass die let-7e-5p weniger exprimiert wird.¹¹⁰ Kong und Du et al. haben bei einer kleinen Patientenkohorte mit einer tiefen Venenthrombose gezeigt, dass die let-7e-5p gegenüber Gesunden vermindert exprimiert wird. Des Weiteren haben sie in Zell- und Tierversuchen gezeigt, dass die miRNA let-7e-5p über die Regulierung eines Fas-Liganden u.a. zur Revaskularisierung nach einer Venenthrombose beitragen kann.¹⁶⁶ Die angiologische bzw. hämatologische Bedeutung dieser miRNA wird durch weitere Studien unterstützt: Plé und Landry et al. zeigten, dass die microRNA let-7-Familie 48% der in Thrombozyten nachweisbaren miRNAs ausmacht. Thrombozyten haben die Fähigkeit microRNA-beladene Mikropartikel zu sezernieren und können so möglicherweise extra-thrombotische Zielzellen ansteuern.¹⁶⁷ Huang und Lv et al. haben untersucht, ob die let-7e-5p als Biomarker für das frühzeitige Erkennen von Risikopatienten für einen ischämischen Schlaganfall nutzbar ist, nachdem sie ein im Blut erhöhtes Expressionsniveau nachweisen konnten.¹⁶⁸ All diese Untersuchungen zeigen, dass der Zusammenhang einer akuten Nierenschädigung bei Sepsis möglicherweise aufgrund von Zirkulationsstörungen der Nieren entstehen und aufgrund einer veränderten Expression der let-7e-5p begründet sein könnte. Die miRNAs der let-7-Familie zeigen zusätzlich in anderen Arbeiten einen eher pro-inflammatorischen Effekt.¹³¹ Es gibt allerdings Einflussfaktoren auf das microRNA-Expressionsmuster, wie zum Beispiel vorbestehende Erkrankungen oder die Dauermedikation der Patienten, die noch gänzlich unerforscht sind. Demirsoy und Ertural et al. haben gezeigt, dass Patienten mit einem Diabetes Mellitus Typ 2 unter Metformintherapie eine verminderte Expression der let-7e-5p gegenüber Diabetes-Patienten ohne Metformintherapie aufweisen.¹⁶⁹ Li et al. haben in einer kleinen Kohorte eine verminderte Expression der let-7e-5p bei Kindern mit Ventrikelseptumdefekt

gefunden und postulieren einen Effekt in der Entwicklung von kardialen Anomalien.¹⁷⁰ Solche und andere Einflüsse müssen berücksichtigt werden.

Mit dem Bedarf einer Nierenersatztherapie korrelierten sogar acht miRNAs: miR-let-7e-5p, miR-378a-3p, -378i, -660-5p, -501-3p, -511-5p, -200b-3p und miR-500a-3p. Es muss jedoch erwähnt werden, dass hier nicht zwischen chronisch niereninsuffizienten Patienten und solchen mit einer AKI die eine akute Nierenersatztherapie erhielten unterschieden wurde. In der Regressionsanalyse zeigte nur die bei Sepsispatienten im Vergleich zu Pneumoniepatienten weniger exprimierte miR-500a-3p (log2FC -1,67) einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau und dem Bedarf einer Nierenersatztherapie während des Beobachtungszeitraumes. Hier führten wir ebenfalls eine ROC-Analyse mit sehr guten Ergebnissen durch (AUC: 0,906 ($p < 0,05$), Sensitivität 90%, Spezifität 83,3%), wobei aufgrund der Studiengröße die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren sind. Die Literaturrecherche unterstützt unsere Ergebnisse, dass die miR-500a-3p bei Patienten mit Nierenschaden vermindert exprimiert wird. Jiang und Liu et al. zeigten, dass in einem in-vitro Model von toxisch (Cisplatin) und hypoxisch induzierter AKI in Tubulusepithelzellen, die miR-500a-3p vermindert exprimiert wird. Bei Überexpression dieser miRNA konnte sogar der Zellschaden/-tod minimiert werden, durch Reduktion der sog. Nekroptose, eine Art des programmierten Zelltodes. Sie bringen die Rolle der miR-500a-3p als protektive anti-inflammatorische miRNA ins Spiel und ein möglicher Nutzen als Therapeutikum.¹⁷¹ In einer anderen Studie wurde dieser Gedanke aufgegriffen und die protektive Funktion der miRNA-500a-3p mittels Liposomen als Transportmittel genutzt.¹⁷²

Das Auftreten einer akuten Nierenschädigung während einer Sepsis oder eines septischen Schocks ist eine bedrohliche, mit einer erhöhten Letalität assoziierten, Komplikation. Im Rahmen der intensivmedizinischen Versorgung sollte das Behandlungsteam stets dafür sensibilisiert sein und das Risiko in die Therapieentscheidungen mit einbeziehen.¹⁶³ Wir konnten zeigen, dass das zirkulierenden miRNA-Expressionsprofil der let-7e-5p und miR-500a-3p Patienten mit einem erhöhten Risiko möglicherweise identifizieren kann.

Die miRNA als Biomarker für die Pneumonie und Sepsis

Ein Biomarker beschreibt einen objektiv messbaren Indikator für normale biologische und pathologische Prozesse des Körpers. Er kann sowohl für die Diagnostik und das Staging einer Erkrankung dienen, sowie für die Einschätzung der Prognose oder den Erfolg einer therapeutischen Behandlung.¹⁷³ Dabei sollte der einzelne und/oder die Kombination der Werte eine gute Sensitivität, Spezifität sowie einen guten positiven und negativen Vorhersagewert haben, damit er zuverlässig zur Diagnostik und Prognoseeinschätzung verwendet werden kann. Wie wahrscheinlich die Erkrankung ist, sollte jedoch im Vornerein anhand der Klinik

beurteilt werden.⁶ Des Weiteren sollte der Nutzen eines Biomarkers sein, dass sich im besten Fall bei der Interpretation eine Tendenz zur Therapieeinleitung und/oder (de)Eskalation erschließen lässt.¹⁰⁸ Zu den am häufigsten im Alltag verwendeten Biomarkern für die Sepsis gelten unter anderem das CRP, PCT und IL-6, wobei nicht der einzelne sondern die Kombination dieser und weiterer Werte eine klinische Relevanz hat.⁹

In Anbetracht dessen, ist das Forschungsgebiet extrazellulärer Vesikel bzw. der miRNA bezüglich der Pneumonie und Sepsis zunehmend von Interesse.^{13, 108, 111, 174, 175} Es gibt viele Arbeiten, die die Rolle der (exosomalen) miRNA bei der Regulation des Immunsystems bzw. Immunantwort unterstreichen.^{39, 45, 157} Zhang et al. haben die bei ihrer Kohorte von Pneumonie- und Sepsispatienten gegenüber Gesunden vermehrt exprimierte miRNA miR-223-3p als Indikator für die Diagnose und Schwere einer Pneumonie-induzierten Sepsis identifizieren können (AUC der ROC Kurve von 0,964).¹³ Zhao und Lu et al. haben die miR-223-3p als möglichen Biomarker bei der Neugeborenensepsis untersucht.¹⁴⁹ Die miR-378a-3p konnte zwischen einem nicht-infektiösen systemischen inflammatorischen Syndrom (SIRS) und einer Sepsis unterscheiden und korrelierte sogar mit dem Schweregrad eines SIRS. Letzteres sogar besser als inflammatorische Zytokine wie das IL-8 und IL-6.^{153, 157} Cao und Zhang et al. haben die miR-145 als möglichen therapeutischen Ansatz bei Sepsis-induzierter akuter Lungenschädigung bzw. pulmonaler Sepsis untersucht.¹³⁴ In unserer Pneumoniekohorte war die miR-145-3p gegenüber Gesunden ebenfalls vermindert exprimiert. Die miR-500a-3p wurde mehrfach mit der Nierenfunktion in Verbindung gebracht und könnte ein Biomarker für eine sepsis-induzierte akute Nierenschädigung sein.^{23, 171, 172}

Die miRNA als Biomarker ist aber nicht frei von Schwierigkeiten und Fehlerquellen. So ist derzeit die miRNA als Biomarker mit einer geringen Spezifität und vor allem Reproduzierbarkeit belastet, da es keine standardisierten Isolier- und Analysemethoden gibt.^{27, 85, 86, 93, 105, 106, 176} Der Zustand, die Vorerkrankungen und die Dauermedikation des Patienten kann zusätzlich zum Teil unerforschte Wirkungsweisen haben, was die Standardisierung zusätzlich erschwert.^{35, 109, 169} Möglicherweise ist das miRNA-Expressionsmuster auch von jeder Person individuell verändert, weswegen verschiedene Studien auf unterschiedliche Ergebnisse kommen können.¹²³ Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch, dass das micro-RNA-Expressionsmuster zum Teil deutlich variieren kann, je nachdem ob man beispielsweise zell-freie miRNA im Serum, exosomale miRNA oder zellgebundene miRNA untersucht. Dies hat unsere Arbeitsgruppe um Reithmair und Buschmann et al. zeigen können. So hat sich das Expressionsmuster zwischen zellgebundenen und zell-freien miRNAs bei Patienten mit septischen Schock im Vergleich zu gesunden Probanden zum Teil deutlich unterschieden: nur 2,91% bzw. 3,90% der verändert exprimierten miRNAs wurden in allen drei Kompartimenten gleichgerichtet hoch- bzw. runterreguliert. Dabei ähnelten sich die Expressionsmuster der extrazellulären miRNAs im Serum und Exosomen und zeigten nur geringe Überschneidungen

mit dem zellulärem microRNA-Expressionsmuster.¹⁷⁷ Die Rolle der miRNA bei Sepsis ist Gegenstand aktueller Forschungen. Zunehmend wird die Funktion der miRNAs in der Aktivierung von pro-inflammatorischen Signalwegen wie die der Tumornekrosefaktoren (TNF) und *toll-like* Rezeptoren (TLR) deutlich, die als Teile des angeborenen Immunsystems auf Infektionen durch Pathogene bei Sepsis reagieren.^{39, 144, 155, 175, 178}

Wir haben eine signifikante Korrelation zwischen der vermindert exprimierten miR-193a-5p und der Dauer des Klinikaufenthaltes bei Pneumoniepatienten gezeigt. Unsere Arbeitsgruppe wiederholte die Untersuchungen in einer zusätzlichen Bestätigungsstudie mit 75 Studienteilnehmer (18 Pneumoniepatienten, 37 Sepsispatienten (30 davon mit septischen Schock) und 20 Volunteers. Aus den gesammelten Ergebnissen konnten 18 miRNAs als potenzielle Biomarker identifiziert werden, darunter die miR-193a-5p.⁷⁶ Weitere Studien müssten zeigen, ob sie auch als ein Biomarker für die Prognose der Krankheitsschwere zu etablieren ist.

Bei der Sepsiskohorte konnten wir einen Zusammenhang zwischen der miR-150-3p und der Dauer des ITS-Aufenthaltes, der miR-1-3p und dem PCT- sowie IL-6-Wert, der miR-501-3p und dem Thrombozytenwert, der miR-378a-3p und dem maximalen Laktatwert an Tag 0, sowie der miR-660-5p und dem Katecholaminbedarf zeigen. Des Weiteren korrelierte die miR-1228-5p mit dem Harnstoffwert und die let-7e-5p sowie die miR-500a-3p konnten als möglicher Biomarker für die Nierenfunktion bei Sepsis identifiziert werden.

Ausgewählte miRNAs in der Literatur

Das Forschungsgebiet der microRNAs in Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsentität ist groß und steht gerade am Anfang. Tabelle 24 ist ein Ausschnitt aktueller Forschungsergebnisse zu ausgewählten signifikant regulierten miRNAs bei unserer Sepsiskohorte.

miRNA (Expression in unserer Arbeit bei Sepsis gegenüber Pneumoniepatienten)	In der Literatur: ↑ Expression	In der Literatur: ↓ Expression
miR-1228-5p (↑)		- Bei Sepsispatienten mit akuter Nierenschädigung (n=6) gegenüber Sepsispatienten ohne Nierenschädigung (n=6)²³ - Bei Exposition von humanen Lungenadenokarzinomzellen in-vitro mit Feinstaub¹⁶⁴ - Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt¹⁶⁵
let-7e-5p (↑)	- Adenovirus-Pneumonie bei Kindern im Alter zwischen 1-3 Jahren (c)¹¹¹ - Latente Tuberkuloseinfektion (c)¹⁷⁹ - Patienten mit ischämischen Schlaganfall¹⁶⁸	- Tiefe Venenthrombose (TVT)¹⁶⁶ - Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 unter Metformintherapie (c)¹⁶⁹ - Ventrikelseptumdefekt (c)¹⁷⁰ - In Vollblut von Patienten mit bakterieller Pneumonie gegenüber Gesunden (c)¹¹⁰
miR-150-3p (↑)	- Sepsis und septischer Schock (c), Korrelation zur Mortalität*¹⁸⁰	- Sepsis (c), Korrelation mit SOFA-Score*¹⁴¹ - In zirkulierenden Monozyten von Sepsispatienten gegenüber Gesunden¹⁴⁴ - Sepsis¹⁷⁵
	- Keine signifikante Expressionsveränderung zwischen Sepsis (schwere Sepsis und septischer Schock) und nicht-Sepsispatienten, aber Korrelation zur reduzierten Nierenfunktion (glomeruläre Filtrationsrate, Kreatinin, Harnstoff), Korrelation zu Laktat und niedrige miR-150 Expression mit schlechterem Outcome verbunden*¹⁴²	
miR-378a-3p (↓)	- Bei Sepsis im Vergleich zu gesunden Probanden, vermehrte Expression¹⁵² - In Exosomen von Patienten mit septischen Schock gegenüber Gesunden¹⁶¹	- Bei Sepsis im Vergleich zu nicht-infektiösem SIRS verminderte Expression (c)¹⁵³
miR-93-5p (↓)	- In zirkulierenden Monozyten von Sepsispatienten gegenüber Gesunden¹⁴⁴ - In Serum von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom¹⁸¹	- Erniedrigtes Expressionsniveau korreliert mit längerem Überleben nach Sepsis bei Krebspatienten¹⁴⁴ - Sepsis¹⁴⁵

Tabelle 24. Fortsetzung nächste Seite

miRNA (Expression in unserer Arbeit bei Sepsis gegenüber Pneumoniepatienten)	In der Literatur: ↑ Expression	In der Literatur: ↓ Expression
miR-660-5p (↓)	- Im Plasma von Lungenkarzinompatienten ¹⁵⁴	
miR-501-3p (↓)	- Im Plasma bei ambulant erworbener Pneumonie ggü. Gesunden (c)* ¹⁸² - Exosomale miR von M2 Makrophagen fördert das Wachstum vom duktales Pankreasadenokarzinom ¹⁸³	- Alzheimerkrankheit (c) ¹⁸⁴ - Verminderte Expression bei gelagerten Thrombozytenkonzentraten an Tag 2-7 ggü. Tag 1 ¹²⁰
miR-500a-3p (↓)	- In Gewebe von Hepatozellulärem Karzinom und Expressionsniveau korreliert mit schlechter Prognose ¹⁸⁵	- In-vitro bei toxischem und hypoxisch induzierter acute-kidney injury (AKI) Model ¹⁷¹ - Bei Patienten mit ischämischen Schlaganfall gegenüber Patienten mit einer transitorischen ischämischen Attacke (TIA) (c) ¹⁸⁶
miR-1-3p (↓)	- In Exosomen von Sepsispatienten (n=3) gegenüber gesunden Probanden (n=3) ¹⁵⁶ - Experimentell in Endothelzellen bei Stimulation mit Zytokinen IL-1β, IL-γ und TNFα ¹³⁶ - Bei Neugeborenen mit early-onset-Sepsis im Vergleich zu gesunden Patienten ¹⁴⁹	
miR-1246 (↓)	- In-vitro bei Lungenepithelzellen nach SARS-Cov2-Infektion ¹³³ - Kann in-vitro die Inflammation bzw. Dysfunktion von Lungenepithelzellen induzieren ¹⁸⁷	- Bei Chronisch obstruktiver Lungenerkrankung und pulmonaler arterieller Hypertonie ¹³³

Tabelle 24. Auswahl unserer signifikant veränderten exprimierten miRNAs bei Sepsis gegenüber Pneumoniepatienten in der Literatur. (c) zirkulierende miRNAs, ↑: vermehrt exprimiert/hochreguliert, ↓: weniger exprimiert/runterreguliert *hier keine Differenzierung zwischen -3p und -5p vorgenommen.
Anm.: Diese Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Exosomen und microRNAs (miRNAs) sind schon seit einigen Jahren fester Bestandteil der klinischen Forschung.^{37, 38, 188} Extrazelluläre Vesikel (ECVs) sind membranumschlossene Mikropartikel, die eine wesentliche Rolle bei der interzellulären Kommunikation spielen und die miRNA enthalten können. Diese vermitteln die Kommunikation benachbarter oder voneinander entfernter Zellen, indem sie über ECVs in diese Zellen aufgenommen werden und dort die Genexpression regulieren.^{27–29, 32, 33, 36, 37} Die Pneumonie ist eine Entzündung des Lungengewebes mit infektiöser oder nicht-infektiöser Genese.¹ Mit jährlich etwa 450 Millionen Fällen weltweit und etwa 4 Millionen Todesfällen gehört sie zu einer der 10 häufigsten Todesursachen.^{3, 4} Die Sepsis ist eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine fehlregulierte Immunantwort des Körpers auf eine Infektion entsteht.¹¹ Sie kann beispielsweise im Rahmen einer Atemwegs- bzw. Lungeninfektion durch Aktivierung sowohl der pro- und anti-inflammatorischen, als auch durch eine Veränderung der kardiovaskulären, neuronalen, hormonellen und koagulatorischen Stoffwechselwegen entstehen.¹¹ Millionen von Menschen erkranken jährlich an einer Sepsis, etwa jeder vierte verstirbt daran.^{14, 138} Die hohe Sterblichkeit ist teilweise durch das Fehlen einzelner sensitiver und spezifischer Biomarker bedingt. Auch wenn bereits mehr als hunderte von Biomarkern in Zusammenhang mit der Sepsis identifiziert worden sind, fehlt es noch an einem schnellen, kostengünstigen und vor allem standardisierten Diagnoseverfahren.^{9, 139, 178}

In dieser Arbeit befassten wir uns mit der Frage, ob man aus dem microRNA-Expressionsmuster von Patienten mit Pneumonie und Sepsis im Vergleich zueinander und zu einer gesunden Vergleichsgruppe, differentiell exprimierte miRNAs identifizieren kann. Vor allem zur Prognoseeinschätzung und bei therapeutischen Entscheidungen könnten diese helfen. MicroRNAs sind 21-25 nt lange nicht-kodierende RNAs, die die Genexpression auf post-transkriptionaler Ebene regulieren.³² Sie sind Teil vieler Stoffwechselwege, u.a. der Apoptose, Zellproliferation und verschiedener Entzündungskaskaden. MiRNAs können Teil der Entstehung oder Behandlung verschiedener Krankheitsbilder sein und sind zunehmend als Biomarker und mögliche Therapeutika von Interesse.^{35, 39, 171, 172}

Es wurden insgesamt 67 Studienteilnehmer aus dem Klinikum Großhadern und Klinikum Neuperlach in München in der Zeit vom April 2015 bis Juli 2017 rekrutiert. Darunter 27 gesunde Probanden (Volunteers), 12 Patienten mit Pneumonie und 28 mit einer Sepsis. Von den letztgenannten hatten 23 Teilnehmer einen septischen Schock.

Aus den gesammelten Serum-Blutproben wurden die Exosomen isoliert und deren microRNA-Inhalt mittels Next-Generation Sequencing erfasst. Aus unseren Proben konnten wir zwischen der ambulant erworbenen Pneumonie und der Volunteer-Gruppe 27 signifikant regulierte

miRNAs isolieren, wobei folgende fünf am meisten vermehrt exprimiert wurden: miR-432-5p, miR-493-3p, miR-4732-5p, miR-495-3p und miR-199-5p und folgende fünf im Vergleich am wenigsten exprimiert: miR-193b-5p, miR-542-3p, miR-885-5p, miR-193a-5p und miR-582-3p. Eine in der Regressionsanalyse bestätigte positive Korrelation zeigte die miR-193a-5p mit der Dauer des Klinikaufenthaltes und die miR-320d mit dem Harnstoffwert an Tag 0. Eine negative Korrelation zeigte die miR-145-3p mit dem Hämoglobinwert, sowie die miR-127-3p mit der Leukozytenzahl, jeweils an Tag 0. Wir führten eine ROC-Analyse durch, ob man anhand des miR-193a-5p Expressionsniveaus die Dauer des Klinikaufenthaltes (sieben bzw. zehn Tage) vorhersagen kann. Aufgrund der Studiengröße konnten keine validen Ergebnisse erzielt werden und müssten in größeren Kohorten bestätigt werden.

Beim Vergleich der Sepsis- und der Pneumoniepatienten, erbrachte die Analyse 25 signifikant verändert exprimierte miRNAs. Eine erhöhte Expression zeigten u. a. die miRNAs miR-1228-5p, miR-4433-3p, miR-4446-3p, miR-370-3p und let-7e-5p. Bei Sepsis wurden u.a. die miR-1246, miR-95-3p, miR-1-3p, miR-500a-3p und miR-200c-3p weniger exprimiert. Eine in der Regressionsanalyse bestätigte Korrelation zeigte sich für die miR-150-3p und der Dauer des intensivmedizinischen Aufenthaltes, der miR-1-3p und dem Procalcitonin- und IL-6-Wert an Tag 0, der miR-501-3p und der Thrombozytenzahl an Tag 0, der miR-378a-3p und dem maximalen Laktatwert an Tag 0, der miR-660-5p und dem Katecholaminbedarf und dem Kreatininwert an Tag 0, sowie der miR-1228-5p und dem Harnstoffwert an Tag 0. In der ROC-Analyse konnten gute Ergebnisse für die miR-150-3p und miR-4446-3p als Biomarker für das Eintreffen hoher Werte bei den SOFA-, APACHE II und MODS Sepsisscores, als Surrogatparameter für die Schwere einer Sepsis, erzielt werden. Zusätzlich gab es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau der let-7e-5p und dem Auftreten einer akuten Nierenschädigung (AKI), sowie der miR-500a-3p und dem Einsatz einer Nierenersatztherapie während der Studie und wir konnten diese zur Risikoeinschätzung bestätigen.

Ausblick

Die Funktion von extrazellulären Vesikel sowie der miRNA in Verbindung mit malignen Tumoren, kardiovaskulären und neurologischen Erkrankungen, sowie Infektionskrankheiten wie der Sepsis, ist Gegenstand aktueller Forschungen.^{2, 29, 108, 144, 186, 189} Über systemische Krankheiten hinaus, könnte die Verwendung von Exosomen als ein Indiz für die funktionelle Reservekapazität bzw. Funktionsfähigkeit eines Organs sein, vor allem in Hinblick auf anästhesiologische und chirurgische Eingriffe bei Patienten im höheren Lebensalter.³³ Exosomen haben das Potential als Biomarker, Impfstoffe und Vehikel für Gentherapien zu dienen und wurden bereits modifiziert, um den Transport einer Fracht zu einer Zielzelle zu erleichtern.⁴² Exosomen sind also nicht nur im Forschungsfeld der Diagnostik interessant,

sondern rücken auch in den Fokus von Therapieentwicklungen. Interessante Ideen zum Beispiel Exosomen als Medikamententransporter für spezifische Empfängerzellen zu entwickeln oder patienteneigene Exosomen und deren miRNA-Gehalt zu modifizieren, um diese als Therapiemittel bei der bakteriellen Sepsis zu nutzen werden entwickelt.^{32, 45} Es gibt Studien in der Krebstherapie, die bereits in der klinischen Phase sind. Beispielsweise wurde gezeigt, dass modifizierte zur Antigenpräsentation genutzte ECV von dendritischen Zellen eine tumor-spezifische Immunantwort beeinflussen können.⁴⁰ Datenbanken wie Vesiclepedia¹⁹⁰ (www.microvesicles.org) oder ExoCarta¹⁹¹ (www.exocarta.org) versuchen einen Überblick über die täglich neuen Erkenntnisse über Exosomen zu verschaffen.

Bezüglich der Exosomen assoziierten miRNA wäre es doch wünschenswert, wenn man anhand des miRNA-Expressionsmuster auf die Pathogenese einer Pneumonie oder Sepsis schließen könnte, indem für einen bestimmten Erreger ein entsprechendes Profil identifiziert wird. Das würde nicht nur die Diagnostik vereinfachen, da viele Fokus- und Erregersuchen ohne Ergebnisse bleiben, sondern würde zu einer schnelleren und gezielteren Therapie führen. Das Gesamtüberleben der Patienten könnte so möglicherweise verbessert werden. Es gibt Studien die zeigen, dass Bakterien nicht nur untereinander über Vesikel mit genomischen Material kommunizieren, sondern auch mit Zellen ihres Wirtes. Dies kann für die Entstehung von Krankheiten mitverantwortlich sein.²⁷ Es gibt schon Arbeiten, die eine Verbindung zwischen der Regulation von miRNAs und einer bakteriellen Infektion nachweisen.³⁵ Führt man diesen Gedanken weiter, sollte es doch möglich sein, dieses bakterielle genetische Material in menschlichen Exosomen nachzuweisen und so eine schnelle Diagnostik zu ermöglichen. Ein anderer Gedanke wäre der Nachweis einer veränderten miRNA bei kranken Patienten im Gegensatz zu Gesunden, der durch den Einfluss eines Erregers auf das microRNA-Expressionsmuster erfolgt. Denn eine Herausforderung in der Therapie einer Sepsis ist, dass nur selten ein ursächliches Pathogen mikrobiologisch bestätigt wird. Nur in 30-40% wird eine kulturpositive Sepsis beobachtet.¹¹ Die Suche nach spezifischen Biomarkern für die Sepsis ist groß und microRNAs rücken hier immer mehr in den Fokus.^{13, 155} Andere interessante Biomarker für die Sepsis werden parallel zunehmend erforscht. Zum Beispiel der Wachstumsfaktor Progranulin, der durch unsere Arbeitsgruppe um Brandes und Borrmann et al., beim Beginn einer Sepsis zum Teil bessere Ergebnisse in der Diskriminierung zwischen Sepsis und Pneumonie erbrachte, als herkömmliche Biomarker wie das CRP und das IL-6.¹⁹²

Neue Therapieansätze der pulmonalen bakteriellen Infektion sowie akuter oder chronischen Infektionen der Lunge, könnten durch eine gerichtete Veränderungen der miRNAs erzielt werden.¹⁰⁹ Dragomir et al. haben in einem Tierversuch die Möglichkeit eines Therapieansatzes der Sepsis durch eine Hemmung der miR-93-5p und folglich eine Modulation der Immunantwort gezeigt.¹⁴⁴ Hong und Sharp et al. haben die miR-200c-5p als mögliches Therapeutikum untersucht. So konnte Einfluss auf den Knochenstoffwechsel ausgeübt

werden, indem sie die miR-200c-5p über Nanopartikel als Vektor in humane Preosteoblasten geschleust haben und so eine Hemmung der Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie dem IL-6, herbeigeführt haben.¹⁹³ Jiang und Liu et al. haben gezeigt, dass bei einem in-vitro Model die miR-500a-3p bei Nierenschädigung weniger exprimiert wird.¹⁷¹ Der zellprotektive Effekt dieser miRNA könnte jedoch genutzt werden, indem Liposomen damit beladen werden. Dies wiesen Zhang und Sun et al. nach, denn sie konnten mit miR-500a-3p beladene Liposomen nutzen, um den Zellschaden und die Entzündungsreaktion bei Cisplatin-induzierter Nierenschädigung zu minimieren.¹⁷² Andere Krankheitsentitäten, die auch als Folge einer Sepsis auftreten können, sind ebenfalls von Interesse. Zum Beispiel zeigen Kong und Du et al. die Möglichkeit der miRNA als Angriffspunkt für neue Therapeutika im Rahmen von tiefen Venenthrombosen.¹⁶⁶

Das Forschungsfeld der RNAs ist bei weitem noch nicht ausgereizt. Eine 2020 veröffentlichte Studie von Khan und Brands et al. brachte eine neue RNA Klasse, die sog. zirkuläre RNA (*engl.* circRNA), zur weiteren Erforschung der Sepsis mit ins Spiel.¹⁹⁴ Während die physiologische Funktion dieser circRNA noch weitgehend unbekannt ist, konnte die Arbeitsgruppe, wenn auch in einer kleinen Untersuchungskohorte, ein differenziertes Expressionsmuster v.a. in Monozyten zwischen Patienten mit einer ambulant erworbenen Pneumonie induzierten Sepsis und gesunden Probanden zeigen.¹⁹⁴

Einer der wichtigsten Aspekte bei all den experimentellen Forschungsergebnissen ist die dringende Notwendigkeit eines standardisiertes Studienprotokoll für die Erforschung von Exosomen und miRNAs, damit Studien aus aller Welt besser miteinander vergleichbar werden. Nur so kann eine globale Integration in den klinischen Alltag ermöglicht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Keramat F, Ghasemi Basir HR, Abdoli E, Shafiei Aghdam A, Poorolajal J: Association of serum procalcitonin and C-reactive protein levels with CURB-65 criteria among patients with community-acquired pneumonia. *International journal of general medicine* 2018;11:217–23.
2. Fu L, Zhu P, Qi S, Li C, Zhao K: MicroRNA-92a antagonism attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary inflammation and injury in mice through suppressing the PTEN/AKT/NF- κ B signaling pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2018;107:703–11.
3. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR: Viral pneumonia. *The Lancet* 2011;377:1264–75.
4. Murray CJL, Lopez AD: Measuring the global burden of disease. *The New England journal of medicine* 2013;369:448–57.
5. Kolditz M, Tesch F, Mocke L, Höffken G, Ewig S, Schmitt J: Burden and risk factors of ambulatory or hospitalized CAP: A population based cohort study. *Respiratory medicine* 2016;121:32–8.
6. Ewig S, Höffken G, Kern WV, Rohde G, Flick H, Krause R, Ott S, Bauer T, Dalhoff K, Gatermann S, Kolditz M, Krüger S, Lorenz J, Pletz M, Roux A de, Schaaf B, Schaberg T, Schütte H, Welte T: Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention - Update 2016. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 2016;70:151–200.
7. Breitling LP, Saum K-U, Schöttker B, Holleczer B, Herth FJ, Brenner H: Pneumonia in the Noninstitutionalized Older Population. *Deutsches Aerzteblatt Online* 2016.
8. Metlay JP, Waterer GW, Long AC, Anzueto A, Brozek J, Crothers K, Cooley LA, Dean NC, Fine MJ, Flanders SA, Griffin MR, Metersky ML, Musher DM, Restrepo MI, Whitney CG: Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2019;200:e45-e67.
9. Raveendran AV, Kumar A, Gangadharan S: Biomarkers and newer laboratory investigations in the diagnosis of sepsis. *The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh* 2019;49:207–16.

10. Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI, Lewis SA, Macfarlane JT: Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: An international derivation and validation study. *Thorax* 2003;58:377–82.
11. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801–10.
12. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, Machado FR, McIntyre L, Ostermann M, Prescott HC, Schorr C, Simpson S, Wiersinga WJ, Alshamsi F, Angus DC, Arabi Y, Azevedo L, Beale R, Beilman G, Belley-Cote E, Burry L, Cecconi M, Centofanti J, Coz Yataco A, Waele J de, Dellinger RP, Doi K, Du B, Estenssoro E, Ferrer R, Gomersall C, Hodgson C, Hylander Møller M, Iwashyna T, Jacob S, Kleinpell R, Klompas M, Koh Y, Kumar A, Kwizera A, Lobo S, Masur H, McGloughlin S, Mehta S, Mehta Y, Mer M, Nunnally M, Oczkowski S, Osborn T, Papathanassoglou E, Perner A, Puskarich M, Roberts J, Schweickert W, Seckel M, Sevransky J, Sprung CL, Welte T, Zimmerman J, Levy M: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Critical care medicine* 2021;49:e1063-e1143.
13. Zhang W, Jia J, Liu Z, Si D, Ma L, Zhang G: Circulating microRNAs as biomarkers for Sepsis secondary to pneumonia diagnosed via Sepsis 3.0. *BMC pulmonary medicine* 2019;19:93.
14. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochweg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellinghan GJ, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith C, Backer DP de, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, van der Poll T, Vincent J-L, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive care medicine* 2017;43:304–77.
15. SepNet Critical Care Trial Group: Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: The prospective, multicentre INSEP study. *Intensive care medicine* 2016;42:1980–9.

16. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, Mendonça A de, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG: 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 medicine* 1996;22:707–10.
17. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent JL: Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA* 2001;286:1754–8.
18. Peres Bota D, Melot C, Lopes Ferreira F, Nguyen Ba V, Vincent J-L: The Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) versus the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score in outcome prediction. *Intensive care medicine* 2002;28:1619–24.
19. Brunkhorst FM, Weigand MA, Pletz M, Gastmeier P, Lemmen SW, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weyland A, Marx G, Bucher M, Gerlach H, Salzberger B, Grabein B, Welte T, Werdan K, Kluge S, Bone HG, Putensen C, Rossaint R, Quintel M, Spies C, Weiß B, John S, Oppert M, Jörres A, Brenner T, Elke G, Gründling M, Mayer K, Weimann A, Felbinger TW, Axer H: S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge: Langfassung. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin* 2020;115:37–109.
20. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE: APACHE II: A severity of disease classification system. *Critical care medicine* 1985;13:818–29.
21. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F: A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 1993;270:2957–63.
22. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ: Multiple organ dysfunction score: A reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Critical care medicine* 1995;23:1638–52.
23. Ge Q-M, Huang C-M, Zhu X-Y, Bian F, Pan S-M: Differentially expressed miRNAs in sepsis-induced acute kidney injury target oxidative stress and mitochondrial dysfunction pathways. *PloS one* 2017;12:e0173292.
24. Lopes JA, Jorge S: The RIFLE and AKIN classifications for acute kidney injury: a critical and comprehensive review. *Clinical kidney journal* 2013;6:8–14.
25. Kellum et al.: KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury: Section 2: AKI Definition. *Kidney international supplements* 2012;2:19–36.
26. Levy MM, Evans LE, Rhodes A: The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 Update. *Critical care medicine* 2018;46:997–1000.

27. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R: Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews* 2012;64:676–705.
28. Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM, Davidson SM: Microvesicles and exosomes: New players in metabolic and cardiovascular disease. *The Journal of endocrinology* 2016;228:R57-71.
29. Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM, Baglio SR: Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & therapeutics* 2018;188:1–11.
30. Abels ER, Breakefield XO: Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and molecular neurobiology* 2016;36:301–12.
31. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J: The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International journal of molecular sciences* 2017;18.
32. Sasso L, Hosamuddin H, Emanuelli C: Extracellular vesicles at the cross-line between basic science and clinical needs. *Microcirculation* 2017;24:e12333-n/a.
33. Yu X, Odenthal M, Fries JWU: Exosomes as miRNA Carriers: Formation-Function-Future. *International journal of molecular sciences* 2016;17.
34. Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, Milito A de, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, Colone M, Tatti M, Sargiacomo M, Fais S: Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:34211–22.
35. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, Suci N, Cretoiu SM, Voinea SC: miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells* 2020;9.
36. Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, Lange T, Samatov TR, Turchinovich AA, Tonevitsky AG: Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 2016;51:33–49.
37. Hammond SM: An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews* 2015;87:3–14.
38. Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu A-L, Zhao Y, McDonald H, Zeng T, Hirst M, Eaves CJ, Marra MA: Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome research* 2008;18:610–21.

39. Curtale G, Renzi TA, Drufuca L, Rubino M, Locati M: Glucocorticoids downregulate TLR4 signaling activity via its direct targeting by miR-511-5p. *European journal of immunology* 2017;47:2080–9.
40. Reiners KS, Dassler-Plenker J, Coch C, Hartmann G: Funktion von extrazellulären Vesikeln und Bedeutung für die labormedizinische Diagnostik. *LaboratoriumsMedizin* 2017;41:741.
41. Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, Cheng HH, Arroyo JD, Meredith EK, Gallichotte EN, Pogosova-Agadjanian EL, Morrissey C, Stirewalt DL, Hladik F, Yu EY, Higano CS, Tewari M: Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014;111:14888–93.
42. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, Martínez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F: Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature communications* 2013;4:2980.
43. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, van Eijndhoven MAJ, Sadek P, Sie D, Zini N, Middeldorp JM, Ylstra B, Menezes RX de, Würdinger T, Meijer GA, Pegtel DM: Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell reports* 2014;8:1649–58.
44. Zhang D, Lee H, Wang X, Groot M, Sharma L, Dela Cruz CS, Jin Y: A potential role of microvesicle-containing miR-223/142 in lung inflammation. *Thorax* 2019;74:865–74.
45. Alexander M, Hu R, Runtsch MC, Kagele DA, Mosbrugger TL, Tolmachova T, Seabra MC, Round JL, Ward DM, O'Connell RM: Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nature communications* 2015;6:7321.
46. Mullokandov G, Baccarini A, Ruzo A, Jayaprakash AD, Tung N, Israelow B, Evans MJ, Sachidanandam R, Brown BD: High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. *Nature methods* 2012;9:840–6.
47. Tsalik EL, Jaggars LB, Glickman SW, Langley RJ, van Velkinburgh JC, Park LP, Fowler VG, Cairns CB, Kingsmore SF, Woods CW: Discriminative value of inflammatory biomarkers for suspected sepsis. *The Journal of emergency medicine* 2012;43:97–106.
48. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR: A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *Journal of chronic diseases* 1987;40:373–83.

49. QIAGEN: miRCURY® Exosome Serum/Plasma Kit: Quick-Start Protocol October 2017. Available at: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=0924f77c-7209-4e35-8a4c-b500c2681fdc&lang=en>. Accessed July 21, 2020.
50. NanoSight: Nanoparticle Tracking Analysis: NanoSight Range [Visualize and measure nanoparticle size and concentration], 2016. Accessed June 15, 2019. Available at: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/nanosight-range/nanosight-lm10>.
51. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, Carr B, Redman CWG, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL: Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2011;7:780–8.
52. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R: Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2010;8:2596–607.
53. Mehdiani A, Maier A, Pinto A, Barth M, Akhyari P, Lichtenberg A: An Innovative Method for Exosome Quantification and Size Measurement.
54. van der Pol E, Coumans F, Varga Z, Krumrey M, Nieuwland R: Innovation in detection of microparticles and exosomes. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2013;11 Suppl 1:36–45.
55. Livshits MA, Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, Generozov EV, Govorun VM: Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific reports* 2015;5:17319.
56. Eitan E, Green J, Bodogai M, Mode NA, Bæk R, Jørgensen MM, Freeman DW, Witwer KW, Zonderman AB, Biragyn A, Mattson MP, Noren Hooten N, Evans MK: Age-Related Changes in Plasma Extracellular Vesicle Characteristics and Internalization by Leukocytes. *Scientific reports* 2017;7:1342.
57. Stolojan V: Nanometrology using the transmission electron microscope. Version: 20150901. San Rafael, Calif., Morgan & Claypool, 2015.
58. Burnette WN: "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* 1981;112:195–203.

59. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979;76:4350–4.
60. Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV: The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert review of proteomics* 2014;11:549–60.
61. Gershoni JM, Palade GE: Protein blotting: Principles and applications. *Analytical biochemistry* 1983;131:1–15.
62. Mahmood T, Yang P-C: Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences* 2012;4:429–34.
63. QIAGEN: miRNeasy® Serum/Plasma Advanced Kit Handbook: For purification of total RNA, including miRNA, from serum and plasma, 2020. Available at: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=20e0ddd1-ad97-43ef-9edf-eef6a6d02a1d&lang=en>. Accessed August 19, 2020.
64. Kong Y: Btrim: A fast, lightweight adapter and quality trimming program for next-generation sequencing technologies. *Genomics* 2011;98:152–3.
65. Andrews S: FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data., 2010. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
66. Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Szczesniak MW, Gaffney DJ, Elo LL, Zhang X, Mortazavi A: A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology* 2016;17:13.
67. Buschmann D, Haberberger A, Kirchner B, Spornraft M, Riedmaier I, Schelling G, Pfaffl MW: Toward reliable biomarker signatures in the age of liquid biopsies - how to standardize the small RNA-Seq workflow. *Nucleic acids research* 2016;44:5995–6018.
68. Petrov AI, Kay SJE, Gibson R, Kulesha E, Staines D, Bruford EA, Wright MW, Burge S, Finn RD, Kersey PJ, Cochrane G, Bateman A, Griffiths-Jones S, Harrow J, Chan PP, Lowe TM, Zwiab CW, Wower J, Williams KP, Hudson CM, Gutell R, Clark MB, Dinger M, Quek XC, Bujnicki JM, Chua N-H, Liu J, Wang H, Skogerbo G, Zhao Y, Chen R, Zhu W, Cole JR, Chai B, Huang H-D, Huang H-Y, Cherry JM, Hatzigeorgiou A, Pruitt KD: RNACentral: An international database of ncRNA sequences. *Nucleic acids research* 2015;43:D123-9.
69. Kozomara A, Griffiths-Jones S: miRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research* 2014;42:D68-73.
70. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL: Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* 2009;10:R25.

71. Love MI, Huber W, Anders S: Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 2014;15:550.
72. Youden WJ: Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950;3:32–5.
73. Kellum et al.: KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury: Section 1: Introduction and Methodology. *Kidney international supplements* 2012;2:13–8.
74. Lavoignet C-E, Le Borgne P, Chabrier S, Bidoire J, Slimani H, Chevrolet-Lavoignet J, Lefebvre F, Jebri R, Sengler L, Bilbault P: White blood cell count and eosinopenia as valuable tools for the diagnosis of bacterial infections in the ED. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 2019;38:1523–32.
75. Vincent JL, Ferreira F, Moreno R: Scoring systems for assessing organ dysfunction and survival. *Critical care clinics* 2000;16:353–66.
76. Hermann S, Brandes F, Kirchner B, Buschmann D, Borrmann M, Klein M, Kotschote S, Bonin M, Reithmair M, Kaufmann I, Schelling G, Pfaffl MW: Diagnostic potential of circulating cell-free microRNAs for community-acquired pneumonia and pneumonia-related sepsis. *Journal of cellular and molecular medicine* 2020;24:12054–64.
77. Hayashi N, Yamaguchi S, Rodenburg F, Ying Wong S, Ujimoto K, Miki T, Iba T: Multiple biomarkers of sepsis identified by novel time-lapse proteomics of patient serum. *PloS one* 2019;14:e0222403.
78. Jung SM, Kim Y-J, Ryoo SM, Kim WY: Relationship between low hemoglobin levels and mortality in patients with septic shock. *Acute and critical care* 2019;34:141–7.
79. Shao W-M, Ye L-W, Zhang L-M, Wang Y-L, Liu H, He D, Zhu J-L, Lyu J, Yin H: Relationship between the magnitude of haemoglobin changes and long-term mortality in patients with sepsis: a retrospective cohort study. *BMC infectious diseases* 2024;24:577.
80. Herold G: Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung, unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung, mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln, Herold, Gerd, 2020, S. 603.
81. Menéndez R, Ferrando D, Vallés JM, Martínez E, Perpiñá M: Initial risk class and length of hospital stay in community-acquired pneumonia. *The European respiratory journal* 2001;18:151–6.
82. Suter-Widmer I, Christ-Crain M, Zimmerli W, Albrich W, Mueller B, Schuetz P: Predictors for length of hospital stay in patients with community-acquired pneumonia: Results from a Swiss multicenter study. *BMC pulmonary medicine* 2012;12:21.

83. Chelluri L, Im KA, Belle SH, Schulz R, Rotondi AJ, Donahoe MP, Sirio CA, Mendelsohn AB, Pinsky MR: Long-term mortality and quality of life after prolonged mechanical ventilation. *Critical care medicine* 2004;32:61–9.
84. Hermann S, Buschmann D, Kirchner B, Borrmann M, Brandes F, Kotschote S, Bonin M, Lindemann A, Reithmair M, Schelling G, Pfaffl MW: Transcriptomic profiling of cell-free and vesicular microRNAs from matched arterial and venous sera. *Journal of extracellular vesicles* 2019;8:1670935.
85. Schageman J, Zeringer E, Li M, Barta T, Lea K, Gu J, Magdaleno S, Setterquist R, Vlassov AV: The complete exosome workflow solution: From isolation to characterization of RNA cargo. *BioMed research international* 2013;2013:253957.
86. Wang J, Yao Y, Wu J, Li G: Identification and analysis of exosomes secreted from macrophages extracted by different methods. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015;8:6135–42.
87. Grätz C, Schuster M, Brandes F, Meidert AS, Kirchner B, Reithmair M, Schelling G, Pfaffl MW: A pipeline for the development and analysis of extracellular vesicle-based transcriptomic biomarkers in molecular diagnostics. *Molecular Aspects of Medicine* 2024;97:101269.
88. Menck K, Bleckmann A, Schulz M, Ries L, Binder C: Isolation and Characterization of Microvesicles from Peripheral Blood. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2017.
89. van der Pol E, Coumans FAW, Grootemaat AE, Gardiner C, Sargent IL, Harrison P, Sturk A, van Leeuwen TG, Nieuwland R: Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2014;12:1182–92.
90. Fernando MR, Jiang C, Krzyzanowski GD, Ryan WL: New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PloS one* 2017;12:e0183915.
91. Prendergast EN, Souza Fonseca MA de, Dezem FS, Lester J, Karlan BY, Noushmehr H, Lin X, Lawrenson K: Optimizing exosomal RNA isolation for RNA-Seq analyses of archival sera specimens. *PloS one* 2018;13:e0196913.
92. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Théry C, Raposo G: Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science* 2013;126:5553–65.

93. El-Khoury V, Pierson S, Kaoma T, Bernardin F, Berchem G: Assessing cellular and circulating miRNA recovery: The impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Scientific reports* 2016;6:19529.
94. Zhao Q, Deng S, Wang G, Liu C, Meng L, Qiao S, Shen L, Zhang Y, Lü J, Li W, Zhang Y, Wang M, Pestell RG, Liang C, Yu Z: A direct quantification method for measuring plasma MicroRNAs identified potential biomarkers for detecting metastatic breast cancer. *Oncotarget* 2016;7:21865–74.
95. Chu CP, Nabity MB: Comparison of RNA isolation and library preparation methods for small RNA sequencing of canine biofluids. *Veterinary clinical pathology* 2019;48:310–9.
96. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M: Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012;2012:251364.
97. Collins FS, Morgan M, Patrinos A: The Human Genome Project: Lessons from large-scale biology. *Science (New York, N.Y.)* 2003;300:286–90.
98. Liu L, Hu N, Wang B, Chen M, Wang J, Tian Z, He Y, Lin D: A brief utilization report on the Illumina HiSeq 2000 sequencer. *Mycology* 2011:169–91.
99. Shendure J, Ji H: Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology* 2008;26:1135–45.
100. Costa-Silva J, Domingues D, Lopes FM: RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PloS one* 2017;12:e0190152.
101. Khang TF, Lau CY: Getting the most out of RNA-seq data analysis. *PeerJ* 2015;3:e1360.
102. Tang M, Sun J, Shimizu K, Kadota K: Evaluation of methods for differential expression analysis on multi-group RNA-seq count data. *BMC bioinformatics* 2015;16:361.
103. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF: 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 research* 2004;64:5245–50.
104. Vandesompele J, Preter K de, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, Paepe A de, Speleman F: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 2002;3:RESEARCH0034.

105. Schlosser K, McIntyre LA, White RJ, Stewart DJ: Customized Internal Reference Controls for Improved Assessment of Circulating MicroRNAs in Disease. *PloS one* 2015;10:e0127443.
106. Gevaert AB, Witvrouwen I, Vrints CJ, Heidbuchel H, van Craenenbroeck EM, van Laere SJ, van Craenenbroeck AH: MicroRNA profiling in plasma samples using qPCR arrays: Recommendations for correct analysis and interpretation. *PloS one* 2018;13:e0193173.
107. Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, Liang M, Dittmar RL, Liu Y, Liang M, Kohli M, Thibodeau SN, Boardman L, Wang L: Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC genomics* 2013;14:319.
108. Raeven P, Zipperle J, Drechsler S: Extracellular Vesicles as Markers and Mediators in Sepsis. *Theranostics* 2018;8:3348–65.
109. Foster PS, Plank M, Collison A, Tay HL, Kaiko GE, Li J, Johnston SL, Hansbro PM, Kumar RK, Yang M, Mattes J: The emerging role of microRNAs in regulating immune and inflammatory responses in the lung. *Immunological reviews* 2013;253:198–215.
110. Poore GD, Ko ER, Valente A, Henao R, Sumner K, Hong C, Burke TW, Nichols M, McClain MT, Huang ES, Ginsburg GS, Woods CW, Tsalik EL: A miRNA Host Response Signature Accurately Discriminates Acute Respiratory Infection Etiologies. *Frontiers in microbiology* 2018;9:2957.
111. Huang F, Zhang J, Yang D, Zhang Y, Huang J, Yuan Y, Li X, Lu G: MicroRNA Expression Profile of Whole Blood Is Altered in Adenovirus-Infected Pneumonia Children. *Mediators of inflammation* 2018;2018:2320640.
112. Peng S, Wang J, Wei S, Li C, Zhou K, Hu J, Ye X, Yan J, Liu W, Gao GF, Fang M, Meng S: Endogenous Cellular MicroRNAs Mediate Antiviral Defense against Influenza A Virus. *Molecular therapy. Nucleic acids* 2018;10:361–75.
113. Liu X, Mao Y, Kang Y, He L, Zhu B, Zhang W, Lu Y, Wu Q, Xu D, Shi L: MicroRNA-127 Promotes Anti-microbial Host Defense through Restricting A20-Mediated De-ubiquitination of STAT3. *iScience* 2020;23:100763.
114. Huang S, Feng C, Zhai Y-Z, Zhou X, Li B, Wang L-L, Chen W, Lv F-Q, Li T-S: Identification of miRNA biomarkers of pneumonia using RNA-sequencing and bioinformatics analysis. *Experimental and therapeutic medicine* 2017;13:1235–44.
115. 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.

116. Ortiz-Quintero B, Buendía-Roldán I, Ramírez-Salazar EG, Balderas-Martínez YI, Ramírez-Rodríguez SL, Martínez-Espinosa K, Selman M: Circulating microRNA Signature Associated to Interstitial Lung Abnormalities in Respiratory Asymptomatic Subjects. *Cells* 2020;9.
117. Sun Y, Xian Y, Duan Z, Wan Z, Li J, Liao Y, Bi X, Wu Z, Wang L, Zhang K: Diagnostic Potential of microRNAs in Extracellular Vesicles Derived from Bronchoalveolar Lavage Fluid for Pneumonia-A Preliminary Report. *Cells* 2022;11.
118. Banaganapalli B, Al-Rayes N, Awan ZA, Alsulaimany FA, Alamri AS, Elango R, Malik MZ, Shaik NA: Multilevel systems biology analysis of lung transcriptomics data identifies key miRNAs and potential miRNA target genes for SARS-CoV-2 infection. *Computers in biology and medicine* 2021;135:104570.
119. Martucci G, Arcadipane A, Tuzzolino F, Occhipinti G, Panarello G, Carcione C, Bertani A, Conaldi PG, Miceli V: Circulating miRNAs as Promising Biomarkers to Evaluate ECMO Treatment Responses in ARDS Patients. *Membranes* 2021;11.
120. Da Maués JHS, Moreira-Nunes CdFA, Pontes TB, Vieira PCM, Montenegro RC, Lamarão LM, Lima EM, Burbano RMR: Differential Expression Profile of MicroRNAs During Prolonged Storage of Platelet Concentrates As a Quality Measurement Tool in Blood Banks. *Omics : a journal of integrative biology* 2018;22:653–64.
121. Santoro RC, Molinari AC, Leotta M, Martini T: Isolated Prolongation of Activated Partial Thromboplastin Time: Not Just Bleeding Risk! *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 2023;59.
122. Rountree KM, Yaker Z, Lopez PP: StatPearls: Partial Thromboplastin Time. Updated 2023 Aug 14. Treasure Island (FL), 2024.
123. Jankowska KI, Sauna ZE, Atreya CD: Role of microRNAs in Hemophilia and Thrombosis in Humans. *International journal of molecular sciences* 2020;21.
124. Li H, Tian X, Wang P, Huang M, Xu R, Nie T: MicroRNA-582-3p negatively regulates cell proliferation and cell cycle progression in acute myeloid leukemia by targeting cyclin B2. *Cellular & molecular biology letters* 2019;24:66.
125. Monterde-Cruz L, Ramírez-Salazar EG, Rico-Martínez G, Linares-González LM, Guzmán-González R, Delgado-Cedillo E, Estrada-Villaseñor E, Valdés-Flores M, Velázquez-Cruz R, Hidalgo-Bravo A: Circulating miR-215-5p and miR-642a-5p as potential biomarker for diagnosis of osteosarcoma in Mexican population. *Human cell* 2018;31:292–9.

126. Cabral BCA, Hoffmann L, Bottaro T, Costa PF, Ramos ALA, Coelho HSM, Villela-Nogueira CA, Ürményi TP, Faffe DS, Silva R: Circulating microRNAs associated with liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Biochemistry and biophysics reports* 2020;24:100814.
127. Yao Y, Xu K, Sun Y, Tian T, Shen W, Sun F, Yuan W, Wu H, Chen G, Yuan L, Zhang W, Lu M, Lei M: MiR-215-5p inhibits the inflammation injury in septic H9c2 by regulating ILF3 and LRRFIP1. *International immunopharmacology* 2020;78:106000.
128. Lutsenko A, Belaya Z, Nikitin A, Solodovnikov A, Lapshina A, Koshkin P, Vorontsova M, Rozhinskaya L, Melnichenko G, Dedov I: Circulating Plasma MicroRNA in Patients With Active Acromegaly. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2022;107:500–11.
129. Fayyad-Kazan M, ElDirani R, Hamade E, El Majzoub R, Akl H, Bitar N, Fayyad-Kazan H, Badran B: Circulating miR-29c, miR-30c, miR-193a-5p and miR-885-5p: Novel potential biomarkers for HTLV-1 infection diagnosis. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2019;74:103938.
130. Alipoor SD, Mortaz E, Tabarsi P, Farnia P, Mirsaeidi M, Garssen J, Movassaghi M, Adcock IM: Bovis Bacillus Calmette-Guerin (BCG) infection induces exosomal miRNA release by human macrophages. *Journal of translational medicine* 2017;15:105.
131. Narożna B, Langwiński W, Szczepankiewicz A: Non-Coding RNAs in Pediatric Airway Diseases. *Genes* 2017;8.
132. Xue S, Liu D, Zhu W, Su Z, Zhang L, Zhou C, Li P: Circulating MiR-17-5p, MiR-126-5p and MiR-145-3p Are Novel Biomarkers for Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Frontiers in physiology* 2019;10:123.
133. Diallo I, Jacob RA, Vion E, Kozak RA, Mossman K, Provost P: Altered microRNA Transcriptome in Cultured Human Airway Cells upon Infection with SARS-CoV-2. *Viruses* 2023;15.
134. Cao X, Zhang C, Zhang X, Chen Y, Zhang H: MiR-145 negatively regulates TGFB β 2 signaling responsible for sepsis-induced acute lung injury. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2019;111:852–8.
135. Sahu A, Jha PK, Prabhakar A, Singh HD, Gupta N, Chatterjee T, Tyagi T, Sharma S, Kumari B, Singh S, Nair V, Goel S, Ashraf MZ: MicroRNA-145 Impedes Thrombus Formation via Targeting Tissue Factor in Venous Thrombosis. *EBioMedicine* 2017;26:175–86.

136. Roessler C, Kuhlmann K, Hellwing C, Leimert A, Schumann J: Impact of Polyunsaturated Fatty Acids on miRNA Profiles of Monocytes/Macrophages and Endothelial Cells-A Pilot Study. *International journal of molecular sciences* 2017;18.
137. Khordadmehr M, Shahbazi R, Sadreddini S, Baradaran B: miR-193: A new weapon against cancer. *Journal of cellular physiology* 2019;234:16861–72.
138. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K: Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2016;193:259–72.
139. Kim MH, Choi JH: An Update on Sepsis Biomarkers. *Infection & chemotherapy* 2020;52:1–18.
140. Zhao D, Li S, Cui J, Wang L, Ma X, Li Y: Plasma miR-125a and miR-125b in sepsis: Correlation with disease risk, inflammation, severity, and prognosis. *Journal of clinical laboratory analysis* 2020;34:e23036.
141. Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, Nicoloso MS, Barbarotto E, Popa M, Stanciulea O, Fernandez MH, Tulbure D, Bueso-Ramos CE, Negrini M, Calin GA: MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PloS one* 2009;4:e7405.
142. Roderburg C, Luedde M, Vargas Cardenas D, 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.
143. Liu F, Peng W, Chen J, Xu Z, Jiang R, Shao Q, Zhao N, Qian K: Exosomes Derived From Alveolar Epithelial Cells Promote Alveolar Macrophage Activation Mediated by miR-92a-3p in Sepsis-Induced Acute Lung Injury. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2021;11:646546.
144. Dragomir MP, Fuentes-Mattei E, Winkle M, Okubo K, Bayraktar R, Knutsen E, Qdaisat A, Chen M, Li Y, Shimizu M, Pang L, Liu K, Liu X, Anfossi S, Zhang H, Koch I, Tran AM, Mohapatra S, Ton A, Kaplan M, Anderson MW, Rothfuss SJ, Silasi R, Keshari RS, Ferracin M, Ivan C, Rodriguez-Aguayo C, Lopez-Berestein G, Georgescu C, Banerjee PP, Basar R, Li Z, Horst D, Vasilescu C, Bertilaccio MTS, Rezvani K, Lupu F, Yeung S-C, Calin GA: Anti-miR-93-5p therapy prolongs sepsis survival by restoring the peripheral immune response. *The Journal of clinical investigation* 2023;133.

145. Yang J, Wu L, Liu S, Hu X, Wang Q, Fang L: Long non-coding RNA NEAT1 promotes lipopolysaccharide-induced injury in human tubule epithelial cells by regulating miR-93-5p/TXNIP axis. *Medical microbiology and immunology* 2021;210:121–32.
146. Qian C, Yan W, Li T, Cui Q, Liu P, Gu M, Guo J, Zhang W, Ren C, Wu T, Deng A: Differential Expression of MiR-106b-5p and MiR-200c-3p in Newly Diagnosed Versus Chronic Primary Immune Thrombocytopenia Patients Based on Systematic Analysis. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2018;45:301–18.
147. Vincent JL, Mendonça A de, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S: 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. *Critical care medicine* 1998;26:1793–800.
148. Godinjak A, Iglica A, Rama A, Tančica I, Jusufović S, Ajanović A, Kukuljac A: Predictive value of SAPS II and APACHE II scoring systems for patient outcome in a medical intensive care unit. *Acta medica academica* 2016;45:97–103.
149. Zhao Y, Lu C, Zhu R, Hu X: Study on identification of a three-microRNA panel in serum for diagnosing neonatal early onset sepsis. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* 2023;36:2280527.
150. Kim BG, Kang S, Han HH, Lee JH, Kim JE, Lee SH, Cho NH: Transcriptome-wide analysis of compression-induced microRNA expression alteration in breast cancer for mining therapeutic targets. *Oncotarget* 2016;7:27468–78.
151. Menon R, Debnath C, Lai A, Guanzon D, Bhatnagar S, Kshetrapal PK, Sheller-Miller S, Salomon C: Circulating Exosomal miRNA Profile During Term and Preterm Birth Pregnancies: A Longitudinal Study. *Endocrinology* 2019;160:249–75.
152. Wang Q, Liu K, Jin C: Clinical value of microRNA-378a-3p in sepsis and its role in sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. *Bioengineered* 2021;12:8496–504.
153. Caserta S, Kern F, Cohen J, Drage S, Newbury SF, Llewelyn MJ: Circulating Plasma microRNAs can differentiate Human Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *Scientific reports* 2016;6:28006.
154. Bedreag OH, Rogobete AF, Dumache R, Sarandan M, Cradigati AC, Papurica M, Craciunescu MC, Popa DM, Luca L, Nartita R, Sandesc D: Use of circulating microRNAs

- as biomarkers in critically ill polytrauma patients. *Biomarkers and Genomic Medicine* 2015;7:131–8.
155. Essandoh K, Fan G-C: Role of extracellular and intracellular microRNAs in sepsis. *Biochimica et biophysica acta* 2014;1842:2155–62.
 156. Gao M, Yu T, Liu D, Shi Y, Yang P, Zhang J, Wang J, Liu Y, Zhang X: Sepsis plasma-derived exosomal miR-1-3p induces endothelial cell dysfunction by targeting SERP1. *Clinical science (London, England : 1979)* 2021;135:347–65.
 157. Caserta S, Mengozzi M, Kern F, Newbury SF, Ghezzi P, Llewelyn MJ: Severity of Systemic Inflammatory Response Syndrome Affects the Blood Levels of Circulating Inflammatory-Relevant MicroRNAs. *Frontiers in immunology* 2017;8:1977.
 158. Costello RA, Nehring SM: StatPearls: Disseminated Intravascular Coagulation (DIC). Treasure Island (FL), 2020.
 159. Wang Y, Wang H, Zhang C, Zhang C, Yang H, Gao R, Tong Z: Plasma Hsa-miR-92a-3p in correlation with lipocalin-2 is associated with sepsis-induced coagulopathy. *BMC infectious diseases* 2020;20:155.
 160. Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG: Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *British journal of haematology* 2009;145:24–33.
 161. Jiao Y, Li W, Wang W, Tong X, Xia R, Fan J, Du J, Zhang C, Shi X: Platelet-derived exosomes promote neutrophil extracellular trap formation during septic shock. *Critical care (London, England)* 2020;24:380.
 162. Liu Q, Du J, Yu X, Xu J, Huang F, Li X, Zhang C, Li X, Chang J, Shang D, Zhao Y, Tian M, Lu H, Xu J, Li C, Zhu H, Jin N, Jiang C: miRNA-200c-3p is crucial in acute respiratory distress syndrome. *Cell discovery* 2017;3:17021.
 163. Liu J, Xie H, Ye Z, Li F, Wang L: Rates, predictors, and mortality of sepsis-associated acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. *BMC nephrology* 2020;21:318.
 164. Li X, Ding Z, Zhang C, Zhang X, Meng Q, Wu S, Wang S, Yin L, Pu Y, Chen R: MicroRNA-1228(*) inhibit apoptosis in A549 cells exposed to fine particulate matter. *Environmental science and pollution research international* 2016;23:10103–13.
 165. Zhong Z, Wu H, Zhong W, Zhang Q, Yu Z: Expression profiling and bioinformatics analysis of circulating microRNAs in patients with acute myocardial infarction. *Journal of clinical laboratory analysis* 2020;34:e23099.

166. Kong L, Du X, Hu N, Li W, Wang W, Wei S, Zhuang H, Li X, Li C: Downregulation of let-7e-5p contributes to endothelial progenitor cell dysfunction in deep vein thrombosis via targeting FASLG. *Thrombosis research* 2016;138:30–6.
167. Plé H, Landry P, Benham A, Coarfa C, Gunaratne PH, Provost P: The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PloS one* 2012;7:e50746.
168. Huang S, Lv Z, Guo Y, Li L, Zhang Y, Zhou L, Yang B, Wu S, Zhang Y, Xie C, Li S, Cheng J: Identification of Blood Let-7e-5p as a Biomarker for Ischemic Stroke. *PloS one* 2016;11:e0163951.
169. Demirsoy İH, Ertural DY, Balci Ş, Çinkır Ü, Sezer K, Tamer L, Aras N: Profiles of Circulating MiRNAs Following Metformin Treatment in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of medical biochemistry* 2018;37:499–506.
170. Li D, Ji L, Liu L, Liu Y, Hou H, Yu K, Sun Q, Zhao Z: Characterization of circulating microRNA expression in patients with a ventricular septal defect. *PloS one* 2014;9:e106318.
171. Jiang L, Liu X-Q, Ma Q, Yang Q, Gao L, Li H-D, Wang J-N, Wei B, Wen J, Li J, Wu Y-G, Meng X-M: hsa-miR-500a-3P alleviates kidney injury by targeting MLKL-mediated necroptosis in renal epithelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2019;33:3523–35.
172. Zhang S, Sun H, Kong W, Zhang B: Functional role of microRNA-500a-3P-loaded liposomes in the treatment of cisplatin-induced AKI. *IET nanobiotechnology* 2020;14:465–9.
173. Biomarkers Definition Working Group: Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2001;69:89–95.
174. Nong W: Long non-coding RNA NEAT1/miR-193a-3p regulates LPS-induced apoptosis and inflammatory injury in WI-38 cells through TLR4/NF-κB signaling. *American journal of translational research* 2019;11:5944–55.
175. Dumache R, Rogobete AF, Bedreag OH, Sarandan M, Cradigati AC, Papurica M, Dumbuleu CM, Nartita R, Sandesc D: Use of miRNAs as biomarkers in sepsis. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)* 2015;2015:186716.
176. Buschmann D, Kirchner B, Hermann S, Märte M, Wurmser C, Brandes F, Kotschote S, Bonin M, Steinlein OK, Pfaffl MW, Schelling G, Reithmair M: Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *Journal of extracellular vesicles* 2018;7:1481321.

177. Reithmair M, Buschmann D, Märte M, Kirchner B, Hagl D, Kaufmann I, Pfob M, Chouker A, Steinlein OK, Pfaffl MW, Schelling G: Cellular and extracellular miRNA s are blood-compartment-specific diagnostic targets in sepsis. *J Cellular Molecular Medi* 2017;21:2403–11.
178. Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T: Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *International journal of molecular sciences* 2016;17.
179. Lyu L, Zhang X, Li C, Yang T, Wang J, Pan L, Jia H, Li Z, Sun Q, Yue L, Chen F, Zhang Z: Small RNA Profiles of Serum Exosomes Derived From Individuals With Latent and Active Tuberculosis. *Frontiers in microbiology* 2019;10:1174.
180. Puskarich MA, Nandi U, Shapiro NI, Trzeciak S, Kline JA, Jones AE: Detection of microRNAs in patients with sepsis. *Journal of Acute Disease* 2015;4:101–6.
181. Shao L, Lu X, Zhou Y, Wang Y, Wang X, Zhuang Z, Gong J: Altered miR-93-5p/miR-18a expression in serum for diagnosing non-small cell lung cancer. *American journal of translational research* 2021;13:5073–9.
182. Hina Naz-Khan et al.: The circulatory small non-coding RNA landscape in health and community-acquired pneumonia in: Sepsis 2017 Paris. Paris, France. September 11-13, 2017. *Intensive care medicine experimental* 2017;5:37:P58.
183. Yin Z, Ma T, Huang B, Lin L, Zhou Y, Yan J, Zou Y, Chen S: Macrophage-derived exosomal microRNA-501-3p promotes progression of pancreatic ductal adenocarcinoma through the TGFBR3-mediated TGF- β signaling pathway. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2019;38:310.
184. Hara N, Kikuchi M, Miyashita A, Hatsuta H, Saito Y, Kasuga K, Murayama S, Ikeuchi T, Kuwano R: Serum microRNA miR-501-3p as a potential biomarker related to the progression of Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications* 2017;5:10.
185. Long J, Liu B, Yao Z, Weng H, Li H, Jiang C, Fang S: miR-500a-3p is a Potential Prognostic Biomarker in Hepatocellular Carcinoma. *International journal of general medicine* 2022;15:1891–9.
186. Toor SM, Aldous EK, Parray A, Akhtar N, Al-Sarraj Y, Abdelalim EM, Arredouani A, El-Agnaf O, Thornalley PJ, Pananchikkal SV, Pir GJ, Ayadathil R, Shuaib A, Alajez NM, Albagha OME: Circulating MicroRNA Profiling Identifies Distinct MicroRNA Signatures in Acute Ischemic Stroke and Transient Ischemic Attack Patients. *International journal of molecular sciences* 2022;24.

187. Fang Y, Gao F, Hao J, Liu Z: microRNA-1246 mediates lipopolysaccharide-induced pulmonary endothelial cell apoptosis and acute lung injury by targeting angiotensin-converting enzyme 2. *American journal of translational research* 2017;9:1287–96.
188. Bartel DP: MicroRNAs. *Cell* 2004;116:281–97.
189. Yang J, Hagen J, Guntur KV, Allette K, Schuyler S, Ranjan J, Petralia F, Gesta S, Sebra R, Mahajan M, Zhang B, Zhu J, Houten S, Kasarskis A, Vishnudas VK, Akmaev VR, Sarangarajan R, Narain NR, Schadt EE, Arghmann CA, Tu Z: A next generation sequencing based approach to identify extracellular vesicle mediated mRNA transfers between cells. *BMC genomics* 2017;18:987.
190. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borràs FE, Breakefield X, Budnik V, Buzas E, Camussi G, Clayton A, Cocucci E, Falcon-Perez JM, Gabrielsson S, Gho YS, Gupta D, Harsha HC, Hendrix A, Hill AF, Inal JM, Jenster G, Krämer-Albers E-M, Lim SK, Llorente A, Lötvall J, Marcilla A, Mincheva-Nilsson L, Nazarenko I, Nieuwland R, Nolte-'t Hoen ENM, Pandey A, Patel T, Piper MG, Pluchino S, Prasad TSK, Rajendran L, Raposo G, Record M, Reid GE, Sánchez-Madrid F, Schiffelers RM, Siljander P, Stensballe A, Stoorvogel W, Taylor D, Thery C, Valadi H, van Balkom BWM, Vázquez J, Vidal M, Wauben MHM, Yáñez-Mó M, Zoeller M, Mathivanan S: Vesiclepedia: A compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS biology* 2012;10:e1001450.
191. Mathivanan S, Simpson RJ: ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* 2009;9:4997–5000.
192. Brandes F, Borrmann M, Buschmann D, Meidert AS, Reithmair M, Langkamp M, Pridzun L, Kirchner B, Billaud J-N, Amin NM, Pearson JC, Klein M, Hauer D, Gevargez Zoubalan C, Lindemann A, Choukér A, Felbinger TW, Steinlein OK, Pfaffl MW, Kaufmann I, Schelling G: Progranulin signaling in sepsis, community-acquired bacterial pneumonia and COVID-19: a comparative, observational study. *ICMx* 2021;9.
193. Hong L, Sharp T, Khorsand B, Fischer C, Eliason S, Salem AK, Akkouch A, Brogden K, Amendt BA: MicroRNA-200c Represses IL-6, IL-8, and CCL-5 Expression and Enhances Osteogenic Differentiation. *PloS one* 2016;11:e0160915.
194. Khan HN, Brands X, Aufiero S, Hoogendijk AJ, Klarenbeek AM, van Engelen TSR, Haak BW, van Vught LA, Horn J, Schultz MJ, Zwinderman AH, van der Poll T, Scicluna BP: The circular RNA landscape in specific peripheral blood mononuclear cells of critically ill patients with sepsis. *Critical care (London, England)* 2020;24:423.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir diese Doktorarbeit ermöglicht haben und mich bei der Fertigstellung immer unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Gustav Schelling für das Anvertrauen dieses interessanten und wichtigen klinischen Themas bedanken. Die Behandlung einer Pneumonie und Sepsis ist ein wichtiger Bestandteil der alltäglichen Intensivmedizin und ich freue mich, dass ich mich ausführlich damit befassen durfte.

Danke auch an Herrn Dr.med. Florian Brandes, Fr. PD Dr.med. Agnes Meidert und Fr. Dr.med. Melanie Borrmann, die als Betreuer und Betreuerinnen jahrelang immer ein offenes Ohr hatten und mir mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite standen. Ein großer Dank gebührt Herrn Dr. Benedikt Kirchner und Herrn Prof. Michael W. Pfaffl der Technischen Universität München (TUM), Weihenstephan, für die Durchführung und bioinformatische Auswertung der molekulargenetischen Analysen und den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors der Klinik für Anaesthesiologie (LMU). Ich möchte auch einen besonderen Dank an Fr. PD Dr.med. Ines Kaufmann aus der Klinik für Anästhesiologie des Städt. Klinikums Neuperlach in München für den Studieneinschluss der Patienten und die Probengewinnung im Rahmen der Exosomen-Studie aussprechen. Ohne deren Arbeit, wären die vielen experimentellen Messungen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Angelika und Matthias Goebel, die mich nicht nur während meines Medizinstudiums und bei dieser Doktorarbeit, sondern in allen Belangen unermüdlich unterstützen. Durch ihren nicht medizinischen Hintergrund und ihr fleißiges Korrekturlesen, haben sie mir dabei geholfen diese Arbeit für alle interessierten Leserinnen und Leser verständlich zu schreiben.

Zuletzt möchte ich noch Christoph Gruber danken, der mir als Lebenspartner die nötigen Zusprüche und Ermutigungen während der Fertigstellung bedingungslos gegeben hat.



Eidesstattliche Versicherung

Goebel, Hanna Hildegard

Name, Vorname

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

Zirkulierende Exosomen und deren miRNA-Gehalt bei Pneumonie und Sepsis

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

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

Traunstein, 09.10.2025

Ort, Datum

Hanna Goebel

Unterschrift Hanna Hildegard Goebel