

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
der Universität zu Köln  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. P. Klußmann

# **Nächtliche Konzentrationsveränderungen zirkulierender microRNAs bei Schlafapnoe- Patienten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Miriam Elisabeth von Krosigk  
aus Windhoek, Namibia

promoviert am 06. Juni 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2022

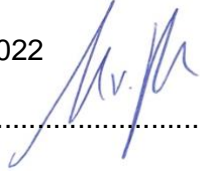


Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 30.09.2022

Unterschrift: .....



<sup>1</sup>Bei kumulativen Promotionen stellt nur die eigenständig verfasste Einleitung und Diskussion die Dissertationsschrift im Sinne der Erklärung gemäß dieser Erklärung dar.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich herzlichst bei Frau Priv.-Doz. Dr. med. Stefanie Jansen, die mich von Anfang an begleitet und unterstützt hat. Ebenso bedanke ich mich beim ärztlichen und pflegerischen Team der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Universität zu Köln, das mich bei der Probenkollektion und Probandenrekrutierung unterstützt hat. Weiterer Dank gilt auch dem Team der kardiologischen Abteilung der Universitätsklinik Bonn, die mich geduldig in die Prinzipien der Probenverarbeitung eingewiesen haben und mir wiederholt mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders bedanke ich mich außerdem auch bei meinen Freunden und Familie, die mich sehr geduldig unterstützt und ermutigt haben.

Gewidmet meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNUNG</b>	<b>8</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>9</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
2.1. Zielsetzung der Studie	11
2.2. Obstruktives Schlafapnoesyndrom	11
2.2.1. Definition und Schweregradeinteilung	11
2.2.2. Prävalenz	12
2.2.3. Therapeutische Optionen	13
2.2.4. Risikofaktoren für die OSAS-Entstehung	13
2.2.5. Kardiovaskuläres Risiko von OSAS-Patienten	15
2.2.6. Diagnostik	16
2.2.7. Potenzielle Biomarker	16
2.3. Zirkulierende miRNAs	16
2.3.1. Definition und Funktion	16
2.3.2. Rolle von miRNAs bei der interzellulären Kommunikation und ihre potenzielle Funktion als Biomarker oder Regulatoren kardiovaskulärer Pathomechanismen	18
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
3.1. Material	20
3.1.1. RNA-Isolation	20
3.1.2. microRNA-Array	20
3.1.3. qPCR	20
3.2. Methoden	21
3.2.1. Allgemeine Probenvorbereitung und -verarbeitung	21
3.2.2. MicroRNA-Quantifizierung durch Microarray-Analyse zur Auswahl der untersuchenden miRNAs	22
3.2.3. Einzelne MicroRNA-Quantifizierung durch qPCR	25
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>28</b>
4.1. Klinische Patientencharakteristik	28
4.2. Detektierbare miRNAs	29

4.3.	Nächtliche miRNA -Konzentrationsunterschiede	30
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>36</b>
5.1.	Interpretation von miRNA-Konzentrationsunterschieden in der vorliegenden Studie	36
5.2.	Einfluss von miR-145 auf das kardiovaskuläre Risiko	38
5.2.1.	Kardiovaskuläres Risiko von OSAS-Patienten	38
5.2.2.	Pathway-Signalling von miR-145	39
5.3.	Möglichkeit der Nutzung von miR-145 als Biomarker	43
5.3.1.	Allgemeine Potenzielle OSAS-Biomarker	43
5.3.2.	Grundlagen für die Nutzung von miRNAs als Biomarker	44
5.3.3.	miRNAs als Diagnostische Marker	45
5.3.4.	miRNAs als Prognostische Marker	48
5.4.	Möglichkeit der therapeutischen Anwendung von miR-145	49
5.5.	Fehler oder Probleme der Analyse	50
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>59</b>
7.1.	Abbildungsverzeichnis	59
7.2.	Tabellenverzeichnis	59
<b>8.</b>	<b>VORABVERÖFFENTLICHUNG VON ERGEBNISSEN</b>	<b>60</b>



## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-converting Enzyme
AHI	Apnoe-Hypopnoe-Index
BMI	Body-Mass-Index
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic Acid
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure – Kontinuierlicher, positiver Beatmungsdruck
CRP	C-reaktives Protein
Ct	Cycle Threshold
ESS	Epworth Sleepiness Scale
HDL	High Density Lipoprotein
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit
miR, miRNA	microRNA
mRNA	Messenger RNA
MP	Mikropartikel
NO	Nitric Oxide, Stickstoffmonoxid
ODI	Oxygen Desaturation Index, Sauerstoffsättigungsindex
OSAS	Obstruktives Schlafapnoesyndrom
OSA	Obstruktives Schlafapnoe
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction, Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	Short interfering RNA
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha

## 1. Zusammenfassung

Das Obstruktive Schlafapnoesyndrom (OSAS) ist eine weit verbreitete Pathologie, deren Ursache in einer periodischen Obstruktion der oberen Atemwege liegt, die zu Phasen nächtlicher Sauerstoffminderversorgung führt. Die Bedeutung von OSAS für die gesamtgesellschaftliche Morbidität und Mortalität wird durch die weltweite Zunahme von Risikofaktoren wie Adipositas stetig größer.<sup>1</sup> Die OSAS-Patienten leiden neben Symptomen, die durch die verminderte Schlafqualität entstehen, vor allem unter einem erhöhten kardiovaskulären Risiko.<sup>2</sup> Der kausale Zusammenhang zwischen OSAS und kardiovaskulären Ereignissen ist hierbei noch nicht gänzlich verstanden, wobei es belegt zu sein scheint, dass OSAS eine Verstärkung von kardiovaskulären Risikofaktoren wie der arteriellen Hypertonie bewirkt.<sup>3</sup> Weiterhin könnte ebenfalls eine durch OSAS veränderte Zusammensetzung von im Blut zirkulierenden microRNAs (miRNAs, miRs) Auswirkungen auf kardiovaskulär bedeutsame Prozesse haben. Zirkulierende miRNAs sind intrazellulär synthetisierte, kurze, nicht-codierende Ribonukleinsäuren. Durch die post-translationale Beeinflussung verschiedener Prozesse üben sie eine regulatorische Funktion aus und können als Reaktion auf unterschiedliche Faktoren ins Blut abgegeben werden.<sup>4</sup> In vorangegangenen Studien ist bereits ein Einfluss von Hypoxien auf die Konzentration im Blut zirkulierender miRNAs nachgewiesen worden,<sup>5</sup> weshalb die Hypothese aufgestellt werden kann, dass durch OSAS ähnliche Effekte zu beobachten sein könnten. Durch eine Wiederaufnahme von zirkulierenden miRNAs in Zellen verschiedener Zielorgane könnten dort pathologische oder physiologische Prozesse reguliert werden,<sup>6</sup> was einen Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko von OSAS-Patienten haben könnte.

Zielsetzung der vorliegenden Studie ist es zu prüfen, wie und in welcher Form nächtliche OSAS-Symptomatik tatsächlich eine akute Veränderung der Konzentrationen zirkulierender miRNAs bewirkt und wie die Veränderung im Kontext kardiovaskulär bedeutsamer Pathomechanismen zu interpretieren ist.<sup>7</sup> Dazu wurden die Konzentrationen zirkulierender miR-127, -133a, -145, -181a sowie miR-505 im Plasma von insgesamt 23 OSAS-Patienten des Universitätsklinikums Köln direkt vor und direkt nach der Nacht untersucht. Während der Nacht wurde polysomnografisch der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) der Patienten ermittelt. Die Auswahl der zu untersuchenden miRNAs erfolgte zunächst über eine relative miRNA-Quantifizierung durch eine Microarray-Analyse von fünf Patienten-Proben. Die anschließende quantitative miRNA-Konzentrationsbestimmung aller Proben erfolgte jeweils über eine Messung per quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (quantitative Polymerase Chain Reaction [qPCR]).<sup>7</sup>

Als Ergebnis zeigte sich, dass insgesamt im Verlauf der Nacht in vielen Fällen deutliche Konzentrationsänderungen zirkulierender miRNAs messbar waren. Ausmaß und Richtung dieser Veränderungen waren bei den verschiedenen miRNAs sowie zum Teil auch

interindividuell unterschiedlich. Bei miR-145 zeigte sich aber eine relativ eindeutige Tendenz in der Veränderung: In morgendlichen Konzentrationsmessungen zeigten sich bei OSAS-Patienten im Vergleich zu abendlichen Messungen signifikant erhöhte miR-145-Konzentrationen.<sup>7</sup>

Angesichts dieses Ergebnisses gilt es zum einen zu diskutieren, inwiefern sich Möglichkeiten der Nutzung von miR-145 als potenzieller Biomarker in der Diagnostik von OSAS ergeben, und zum anderen zu untersuchen, welche Veränderungen in physiologischen oder pathologischen Prozessen sich durch die gemessenen miR-145-Konzentrationsunterschiede bei OSAS-Patienten ergeben könnten. Dies ist insofern von Bedeutung, da miR-145 bereits in verschiedenen vorangegangenen Studien eine Rolle im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen zugesprochen wurde und diese miRNA damit möglicherweise einen weiteren erklärenden Ansatz für den zugrunde liegenden Pathomechanismus der kardiovaskulären Risikoerhöhung von OSAS-Patienten darstellen könnte. Da miR-145 in unterschiedlichen Studien zum Teil kardioprotektive<sup>8</sup> und zum anderen aber auch kardiovaskulär schädigende Eigenschaften<sup>9</sup> zugesprochen wurden, gilt es die genaue Art des Zusammenhanges weiterführend zu untersuchen. Ebenso ist eine weiterführende Analyse der zeitlichen Dynamik der nächtlichen miRNA-Veränderungen bei OSAS ausstehend sowie der Vergleich mit einer gesunden Gesamtbevölkerung, der im Rahmen dieser Studie aufgrund ihres Pilot-Charakters noch nicht stattfinden konnte. Nichtsdestotrotz können die Ergebnisse der vorliegenden Studie aber als Hinweis auf das große Potenzial der Nutzung von zirkulierenden miRNAs gewertet werden, sowohl im Hinblick auf das Verständnis pathomechanischer Vorgänge als auch auf Diagnostik von OSAS und Einschätzung des kardiovaskulären Risikos von OSAS-Patienten.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Zielsetzung der Studie**

Im Kontext der Schlafmedizin nimmt das Obstruktive Schlafapnoesyndrom (OSAS) eine sehr prominente Rolle ein. Es ist nicht nur sehr verbreitet, sondern stellt auch einen Risikofaktor für andere klinische Erscheinungsbilder und Pathologien dar. Da das OSAS beispielsweise kardiovaskuläre Erkrankungen begünstigt, stellt es klinisch und auch wissenschaftlich eine Schnittstelle zwischen dem Fachbereich der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde und denen anderer klinischer Disziplinen wie der Kardiologie dar. Die Krankheit nimmt an Bedeutung immer weiter zu, weshalb ein differenziertes und tiefgründiges Verständnis der zugrunde liegenden Pathomechanismen von elementarer Bedeutung ist. In der vorliegenden Studie wird der Zusammenhang von OSAS und Konzentrationsveränderungen zirkulierender microRNAs (miRNAs, miRs) untersucht. Letztere stellen einen Forschungsbereich dar, der in den letzten Jahren ebenfalls stark an Popularität gewonnen hat, da die enorme Bedeutung von miRNAs zum einen als Biomarker für diverse Pathologien, zum anderen als wichtige Stellschraube in verschiedenen funktionalen oder dysfunktionalen körpereigenen Regulationsmechanismen in vielen Studien erkannt und belegt werden konnte. Das Ziel dieser Studie ist es daher, den Einfluss von OSAS auf die Konzentration zirkulierender miRNAs zu untersuchen. Im Folgeschritt soll diskutiert werden, ob diese Ergebnisse zu einem tieferen Verständnis des Zusammenhanges zwischen OSAS und kardiovaskulären Erkrankungen beitragen könnten und ob sie möglicherweise Anwendung im Bereich der Biomarker-Diagnostik oder der OSAS-Therapie finden könnten.<sup>7</sup>

### **2.2. Obstruktives Schlafapnoesyndrom**

#### **2.2.1. Definition und Schweregradeinteilung**

Das Obstruktive Schlafapnoe-Syndrom ist eine schlafbezogene Atmungsstörung, die in breiten Teilen der Bevölkerung auftritt. Mit einem Anteil von 85% ist OSAS die bei Weitem häufigste schlafbezogene Atmungsstörung.<sup>10</sup> Bei den betroffenen Patienten kommt es durch einen Kollaps der Schlundmuskulatur zu einer Obstruktion der Atemwege und Phasen der Sauerstoffminderversorgung mit anschließenden kurzen Weckreaktionen, sogenannten Arousals.

Beim OSAS wird unterschieden zwischen Apnoephasen und Hypopnoephasen. Bei Apnoephasen kommt es zu einer Reduktion des Atemflusses um mindestens 90% über eine Zeitspanne von mindestens 10 Sekunden. Von Hypopnoephasen wird definitionsgemäß gesprochen, wenn es zu einer Reduktion des Atemflusses um mehr als 30% für mehr als 10 Sekunden kommt, in Kombination mit einem Abfall der Sauerstoffsättigung um mindestens 4% oder einem Arousal.<sup>10</sup>

Zur Schweregradeinteilung des OSAS wird der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) herangezogen, der Apnoe- sowie Hypopnoephasen pro Stunde Schlafzeit misst. Die Diagnose OSAS wird gemäß internationaler Definition ab einem AHI-Wert von mindestens 5 und gleichzeitig auftretenden typischen Symptomen gestellt.<sup>10</sup> Bei einem AHI von 5-15 geht man von einer milden Ausprägung aus. Werte zwischen 15-30 sprechen für ein mittelstarkes OSAS, während bei einem AHI von mehr als 30 ein schweres OSAS diagnostiziert werden kann.<sup>11</sup> Zu den typischerweise zu erwartenden Symptomen zählen starkes, unregelmäßiges Schnarchen und ausgeprägte Tagesmüdigkeit gegebenenfalls in Kombination mit Leistungsminderung, Depressionen und Potenzstörungen.<sup>12</sup> Das Ausmaß der Tagesmüdigkeit lässt sich mit der Epworth Sleepiness Scale (ESS) darstellen. Dabei müssen die Patienten in einem Fragebogen angeben, als wie wahrscheinlich sie ein Einschlafen in verschiedenen Alltagssituationen bewerten. Aus diesen Angaben kann dann eine Punktschätzung errechnet werden, die eine relative Vergleichbarkeit von Tagesmüdigkeit ermöglicht.<sup>13</sup> Eine der frühen Studien, die diese Zusammenhänge zwischen OSAS und Tagesmüdigkeit aufgezeigt hat, stammt von der Arbeitsgruppe um Gottlieb et al., die in ihren Untersuchungen bei Männern und bei Frauen signifikante Korrelationen zwischen AHI- und ESS-Werten feststellen konnten.<sup>14</sup>

### **2.2.2. Prävalenz**

Die Diagnose OSAS hat in den letzten Jahren stark zugenommen.<sup>11</sup> Es ist jedoch noch unklar, welcher Anteil an dieser Zunahme durch Lebensstiländerung in breiten Teilen der Weltbevölkerung zu erklären ist und welcher Anteil auf eine verbesserte und breitere Diagnostik zurückzuführen ist. Franklin und Lindberg haben 2015 in einem Review die weltweit verfügbaren Prävalenzstudien aus den Jahren 1993 bis 2013 zusammengefasst. Ihre Ergebnisse zeigen über die Jahre eine durchschnittliche OSAS-Prävalenz bei Männern von 6% und bei Frauen von 4%. Die Prävalenz-Werte der asymptotischen Obstruktiven Schlafapnoe (OSA), die ohne Tagesmüdigkeit aber mit Schnarchen auftritt, liegen mit durchschnittlich 22% bei Männern und 17% bei Frauen allerdings deutlich höher.<sup>1</sup> Außerdem konnte auch hier ein Anstieg der Prävalenz beobachtet werden, da die OSA-Prävalenz der jüngsten, hier betrachteten Studie bei 37% für Männer<sup>15</sup> und 50% für Frauen<sup>16</sup> lag. Wenn man die weltweite Zunahme der Prävalenz von Adipositas betrachtet,<sup>17</sup> die einen der Risikofaktoren für OSAS darstellt, spricht dies ebenfalls dafür, dass auch die OSAS-Prävalenz weltweit ansteigt und in Zukunft noch weiter steigen wird. Zudem ist davon auszugehen, dass es bei OSAS eine sehr hohe Dunkelziffer gibt, da die Symptome oft sehr unspezifisch sind und die Krankheit daher stark unterdiagnostiziert und entsprechend auch untertherapiert ist.<sup>10</sup> Young et al. gehen davon aus, dass inzwischen jeder fünfte Erwachsene zumindest ein mildes OSAS aufweist und einer aus 15 Erwachsenen unter einem mindestens mittelgradigen OSAS leidet.<sup>18</sup> Wenn man spezifisch Risikogruppen betrachtet, wie beispielsweise Männer und Frauen mit Adipositas, lässt sich hier sogar eine OSAS-Prävalenz von 40% feststellen.<sup>18</sup>

### **2.2.3. Therapeutische Optionen**

Therapeutisch sieht die Leitlinie bei mittelschwerem bis schwerem OSAS eine Behandlung mit kontinuierlichem, nasalem, positivem Beatmungsdruck (continuous positive airway pressure [CPAP]) vor. Diese Behandlung zeigt große Erfolge in der Verminderung des AHI und in der Reduzierung von Tagesmüdigkeit und kardiovaskulärer Mortalität.<sup>10</sup> Es konnte auch gezeigt werden, dass frühe arteriosklerotische Veränderungen durch eine CPAP-Therapie wieder rückgängig gemacht werden konnten.<sup>19</sup> Das größte Problem bei der CPAP-Behandlung ist eine mangelnde Compliance, von der vermutet werden kann, dass sie bei Werten um die 40% liegt. Grund dafür ist primär der mangelnder Tragekomfort.<sup>20</sup>

Alternativ zur CPAP-Beatmung können auch Zahnschienen verwendet werden, die einen Vorschub des Unterkiefers bewirken, was allerdings oft nur bei Patienten mit milder Symptomatik einen ausreichenden Effekt hat.<sup>21</sup> Bei schweren OSAS-Fällen kann außerdem auch eine chirurgische Therapie in Betracht gezogen werden. Meistens wird hierbei eine Uvulopalatopharyngoplastie durchgeführt. Hierbei wird Gewebe aus dem hinteren Rachenbereich entfernt. Allerdings konnte bisher kein klarer Vorteil gegenüber der CPAP-Therapie festgestellt werden.<sup>22</sup> Eine weitere Technik sieht eine maxillo-mandibuläre Osteotomie mit Protrusion vor, die den palatopharyngealen Raum vergrößert,<sup>10</sup> was bisher vielversprechende Ergebnisse geliefert hat.<sup>23</sup> Allerdings sind die Ergebnisse dieser alternativen Therapieansätze oft nicht ganz eindeutig und es sind weitere Untersuchungen und Studien zu ihrer Wirksamkeit erforderlich.

Eine weitere Therapiemöglichkeit stellt die Implantation eines Zungenschrittmachers dar. Dieser verhindert das Entstehen einer OSAS-Symptomatik über die Stimulation des N. hypoglossus. Verschiedene prospektive Studien bescheinigen dieser Behandlungsmethode eine relativ gute Wirksamkeit, allerdings eignet sie sich nicht für alle Patienten dieses Kollektivs.<sup>24</sup>

Als wichtiger Bestandteil der Therapie sollte außerdem immer eine Reduktion von Risikofaktoren des OSAS angestrebt werden. Dies ist essenziell und zeigt bei Erfolg eine sehr große Wirkung.

### **2.2.4. Risikofaktoren für die OSAS-Entstehung**

Wichtigster Risikofaktor ist an erster Stelle Adipositas. Weitere begünstigende Faktoren für das OSAS sind männliches Geschlecht, Alter, Alkohol- und Tabakkonsum, die Einnahme von Sedativa oder Beta-Blockern und ein kleiner Kiefer sowie ein großer Halsumfang.<sup>10</sup>

Ein Hinweis für den erheblichen Zusammenhang zwischen OSAS und Adipositas ist die Tatsache, dass ein Großteil der OSAS-Patienten einen erhöhten Body-Mass-Index (BMI) hat. Young et al. konnten feststellen, dass 58% der mindestens mittelschweren OSAS-Fälle ihrer Studie auf einen BMI von über 25 zurückzuführen waren.<sup>25</sup> Im Einklang damit stehen die Ergebnisse von Studien, die belegen konnten, dass der Schweregrad des OSAS durch eine

Gewichtsreduktion vermindert werden kann.<sup>26</sup> Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang wurde von Shelton et al. untersucht, die zu der Schlussfolgerung gekommen sind, dass die Menge von pharyngealem Fettgewebe einen Einfluss auf die Entstehung von OSAS hat.<sup>27</sup> Fettablagerungen im Hals-Thoraxbereich verengen und destabilisieren die Atemwege und begünstigen dadurch deren Kollaps.<sup>28</sup>

Ursachen für die Differenz in der Prävalenz bei Männern und Frauen könnten auch wiederum eine unterschiedliche Verteilung von Fettgewebe sowie hormonelle Unterschiede sein.<sup>1</sup> Eine hormonelle Wirkung scheint wahrscheinlich, da die Prävalenz in der weiblichen Bevölkerung vor und nach der Menopause deutliche Unterschiede aufweist.<sup>29</sup> Wie groß der Unterschied in der Prävalenz zwischen den Geschlechtern tatsächlich ist, lässt sich noch nicht mit Sicherheit sagen. Die Schätzungen des Prävalenz-Verhältnisses zwischen Männern und Frauen reichen von 2:1 bis 4:1.<sup>29</sup> Im klinischen Kontext erscheinen die Unterschiede allerdings deutlich größer,<sup>1</sup> was die Annahme zulässt, dass Frauen im Hinblick auf OSAS deutlich unterdiagnostiziert werden. Dies mag zum einen soziokulturelle Ursachen haben, könnte aber auch in einer unterschiedlichen klinischen Präsentation der OSAS-Symptomatik bei weiblichen Patienten begründet sein.<sup>30</sup>

In Bezug auf den Risikofaktor Alter lässt sich festhalten, dass es mit zunehmendem Alter zu einer Zunahme der OSAS-Prävalenz, unabhängig von anderen Risikofaktoren, kommt.<sup>31</sup> Gleichzeitig scheint es mit zunehmendem Alter zu einem relativ verminderten Schweregrad der Symptomatik zu kommen.<sup>32</sup> Nichtsdestotrotz ist OSAS eine Krankheit, die prinzipiell in jedem Alter, also auch bei Kindern, auftreten kann.<sup>33</sup>

Der Effekt von Alkohol auf das Schnarchen bzw. die Entstehung eines OSAS lässt sich primär durch die alkoholbedingte Hypotonie der oropharyngealen Muskulatur erklären, die eine bestehende Neigung zum Kollaps der Schlundmuskulatur verstärkt.<sup>34</sup> In Laborstudien konnte nach Alkoholkonsum dementsprechend eine Zunahme von Anzahl und Dauer der Apnoephasen bei OSAS-Patienten festgestellt werden.<sup>35</sup>

Bezüglich des Nikotin-Konsums gibt es Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen der Anzahl pro Tag gerauchter Zigaretten und dem Schweregrad des OSAS feststellen konnten.<sup>36</sup> Sowohl die Arbeitsgruppen um Krishnan et al. als auch die um Trenchea et al. konnten diesen Zusammenhang bestätigen.<sup>37,38</sup> Insbesondere starkes Rauchen scheint zu einer Aggravation des OSAS zu führen, da sowohl AHI-Werte steigen als auch die nächtliche Sauerstoffsättigung vermindert wird.<sup>39</sup> Der Grund dafür liegt vermutlich in der Verstärkung der Inflammation von Atemwegen.<sup>40</sup>

Der Risikofaktor des kleinen Kiefers und Kinns sowie des großen Halsumfangs lässt sich relativ einfach durch die OSAS-Entstehung erklären. Grundlegende Bedingung für einen Kollaps der Schlundmuskulatur ist die Muskelrelaxation, zu der es physiologisch während des Schlafes kommt. Bei gesunden Individuen ohne OSAS führt dies jedoch noch nicht zu einer

kompletten oder inkompletten Verlegung des Pharynx und dadurch auch zu keiner Hypoxie. Bei OSAS-Patienten kommt es aufgrund anatomischer Limitierungen, wie einem kleinen Kiefer oder erhöhtem Anteil an pharyngealem Weichgewebe, zu einer Addition dieser Faktoren, was bei einer zusätzlichen Muskelrelaxation während des Schlafes zu einem mehr oder weniger kompletten Verschluss der Atemwege und damit zu einer kurzzeitigen Hypoxie führt.<sup>10</sup> Beispielhaft verdeutlichen lässt sich dies durch eine Studie von Nuckton et al., die eine direkte Korrelation zwischen Mallampati-Score und OSAS-Wahrscheinlichkeit feststellen konnten.<sup>41</sup>

### **2.2.5. Kardiovaskuläres Risiko von OSAS-Patienten**

Zu den erheblichen physischen und psychischen sowie sozialen und behavioralen Konsequenzen des OSAS, die zu einem großen Teil durch die Tagesmüdigkeit bedingt sind, kommt außerdem eine deutlich erhöhte kardiovaskuläre Morbidität.<sup>42</sup> OSAS scheint Auswirkungen auf die Entwicklung bzw. die Exazerbation verschiedener kardiovaskulärer Pathologien zu haben. Exemplarisch zu nennen wären hier die Koronare Herzerkrankung (KHK), Herzrhythmusstörungen sowie die Kardiomyopathie.<sup>2</sup>

Der zugrunde liegende Pathomechanismus im Hinblick auf das erhöhte kardiovaskuläre Risiko ist noch nicht vollständig verstanden. Es bleibt zu fragen, inwieweit OSAS hier wirklich direkt zur Entstehung und Entwicklung der Krankheit selbst beiträgt oder ob viel eher davon auszugehen ist, dass OSAS indirekt durch die Beeinflussung kardiovaskulärer Risikofaktoren wirkt. Primär lässt sich hier beobachten, dass es aufgrund des OSAS in einer Vielzahl von Fällen zu einer Hypertonie bzw. zu einer Verstärkung einer bereits existenten Hypertonie kommt.<sup>3</sup> Der entscheidende Faktor scheint hierbei am ehesten die intermittierende Hypoxie zu sein, die als Resultat des OSAS auftritt und eine anhaltende sympathische Überstimulation bewirkt.<sup>43</sup> Als zusätzlicher Beweis für den kausalen Zusammenhang zwischen Hypertonus und OSAS kann erneut die Tatsache herangezogen werden, dass es durch eine CPAP-Therapie unter anderem auch zu einer Senkung des Blutdruckes kommt.<sup>44</sup>

Weiterhin deuten verschiedene Studien darauf hin, dass es durch OSAS zu einer verstärkten Inflammationsreaktion kommt, was sich auch in einem Anstieg von Entzündungsmarkern widerspiegelt. Auch in diesem verstärkten Entzündungsgeschehen kann ein Risikofaktor für Endothelschädigung und kardiovaskuläre Ereignisse gesehen werden.<sup>2</sup>

Als dritten kardiovaskulären Risikofaktor, der potenziell durch OSAS beeinflusst wird, identifizieren Monahan und Redline die Dyslipidämie.<sup>2</sup> Auch hier gibt es Evidenzen, dass die intermittierenden Hypoxien Veränderungen im hepatischen Lipidmetabolismus induzieren, wengleich die Kausalitäten in diesem Bereich noch nicht vollständig geklärt werden konnten.<sup>45</sup>

Insgesamt scheint OSAS eine erhebliche Rolle bei der Entwicklung, Aggravation und Therapie von verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen zu spielen und vor allem auch im Hinblick auf die Mortalität ein entscheidender Faktor zu sein.<sup>46</sup> Dies sollte Anlass des Bestrebens sein,



die OSAS-Diagnostik zu optimieren, damit kardiovaskulär gefährdete Personen möglichst frühzeitig und möglichst sensitiv identifiziert und behandelt werden können.

### **2.2.6. Diagnostik**

Aufgrund der starken und weiter zunehmenden Verbreitung und den relativ schwerwiegenden Konsequenzen im Hinblick auf Komplikationen und Mortalität ist eine Optimierung von OSAS-Diagnostikmöglichkeiten, besonders im Hinblick auf Früherkennung und Schweregradeinschätzung, sehr relevant. Bisher kommt als Diagnostiktool neben der Eigen- und Fremdanamnese fast ausschließlich die Polysomnographie zum Einsatz, die in diesem Fall als Goldstandard gilt.<sup>46</sup> Sie ermöglicht eine umfassende Messung nächtlicher Schwankungen von Herz- und Atemfrequenz. Diese Diagnostik ist für die behandelnde Klinik und für den Patienten mit einem nicht unerheblichen zeitlichen Aufwand verbunden, da der Patient oft eine Nacht in einer klinischen Einrichtung, in der die Schlafdiagnostik stattfindet, verbringen muss. Alternativ möglich ist die ambulante Polygraphie, die jedoch vor allem im Hinblick auf die Einschätzung des OSAS-Schweregrad weniger sensitiv ist.<sup>47</sup> Es sollte daher definitiv Ziel der OSAS-Forschung sein, die Diagnostik zu vereinfachen und zu beschleunigen sowie neue Methoden zu entwickeln, die eine möglichst genaue Abschätzung des kardiovaskulären Risikos erlauben.

### **2.2.7. Potenzielle Biomarker**

Für die OSAS-Diagnostik könnten Biomarker in Zukunft eine entscheidende Rolle spielen. Diese erlauben im idealen Fall breite Screenings bei verhältnismäßig geringem Zeit- und Kostenaufwand. Kriterien für einen Biomarker sollten einerseits eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität sowie Reversibilität nach Therapie sein. Andererseits sollte es früh zu einer Wert-Veränderung kommen, möglichst vor dem Auftreten eigentlicher klinischer Symptome. Außerdem sollte ein Biomarker im Idealfall den Schweregrad der Erkrankung adäquat darstellen, einen Cut-Off-Wert zur Diagnose enthalten und aus ökonomischer Sicht die krankheitsspezifischen Kosten für das Gesundheitssystem minimieren.<sup>42</sup>

Sowohl klinisch als auch in Studien wurden bereits einige der bekannten Biomarker auf ihre Tauglichkeit bei der OSAS-Diagnostik getestet. Diskutiert wurden hier bisher primär pro-inflammatorische Marker, die auch mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert sind. Die Konzentration dieser inflammatorischen Moleküle wird durch OSAS erheblich gesteigert, allerdings sind diese Marker im Allgemeinen auch sehr unspezifisch und dadurch in diesem Fall möglicherweise nur bedingt als spezifische Marker geeignet.<sup>48</sup>

## **2.3. Zirkulierende miRNAs**

### **2.3.1. Definition und Funktion**

Neben den klassischen Biomarkern könnte es auch die Möglichkeit geben, miRNAs als Biomarker zu verwenden. Diese wurden in den vergangenen Jahren zunehmend bei

verschiedenen Pathologien als potenzielle Ergänzung zum klassischen Spektrum der Biomarker ins Spiel gebracht und könnten daher auch bei OSAS möglicherweise eine wegweisende Rolle spielen.

miRNAs sind kurze, nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (RNAs) mit einer Länge von 19 bis 24 Nukleotiden,<sup>4</sup> die post-translational Prozesse wie die Angiogenese, Apoptose, Zellteilung und -differenzierung beeinflussen.<sup>49</sup> Es ist davon auszugehen, dass mindestens 30% der menschlichen Gene durch miRNAs hochspezifisch reguliert werden.<sup>49</sup> Dieser Prozess findet normalerweise durch eine komplementäre Bindung an die 3'UTR-Region der Ziel-messenger-RNA (mRNA) statt, wodurch es zu einem Gen-Silencing kommt. Der Grad der Komplementarität entscheidet dabei darüber, ob dies über eine Translationshemmung oder die mRNA-Degradierung geschieht.<sup>50</sup> Weiterhin konnte aber auch beobachtet werden, dass es unter bestimmten Bedingungen auch zur Bindung an andere mRNA-Regionen wie die 5'UTR- oder Genpromoter-Regionen kommen kann und dass es durch die komplementäre miRNA-Bindung auch zu einer Aktivierung und Verstärkung der entsprechenden mRNA-Translation kommen kann.<sup>6</sup> Dabei lässt sich feststellen, dass miRNAs multivalent agieren und ein einzelnes miRNA-Molekül die Translation vieler verschiedener mRNAs und damit vieler verschiedener Gene beeinflussen kann.<sup>51</sup>

Neben den intrazellulären miRNAs, von denen auszugehen ist, dass sie eine erhebliche Rolle in der Regulation der Gen-Expression spielen, lassen sich auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Blutplasma und -serum, Urin, Liquor und Spucke miRNAs isolieren.<sup>6</sup> Es ist also davon auszugehen, dass intrazelluläre miRNAs durch verschiedene Prozesse in den extrazellulären Raum verschoben werden und dort eine Rolle bei der interzellulären Kommunikation spielen, indem sie zelluläre Aktivität autokrin, parakrin oder endokrin regulieren.<sup>4</sup> Verschiedene Studien belegen, dass es neben einem Vesikeltransport<sup>52</sup> aus der Zelle auch einen Proteinkomplex-gebundenen Transport<sup>53</sup> von miRNAs gibt. Weiterhin konnte sogar eine direkte miRNA-Übertragung von Zelle zu Zelle über Gap-Junctions beobachtet werden.<sup>54</sup>

Im Plasma lassen sich letztendlich also zwei Arten von miRNAs finden: Einerseits proteinassoziierte miRNAs, die unter anderem gebunden an Argonautproteine oder High-Density-Lipoproteine (HDL) vorliegen und andererseits vesikelgebundene miRNAs in Exosomen, Mikrovesikeln oder apoptotischen Körpern.<sup>4</sup> In welchem Verhältnis freie proteingebundene und vesikuläre miRNAs im Plasma vorliegen, konnte bisher nicht endgültig geklärt werden und scheint auch von der Art der miRNA, dem jeweiligen zellulären Ursprung und anderen individuellen Faktoren abhängig zu sein.<sup>6</sup> Die Differenzierung zwischen einzelnen vesikulären Strukturen erfolgt vor allem anhand ihrer Größe. Exosomen stellen mit 30-100 nm die kleinste Subgruppe dar und entstammen dem endoplasmatischen Netzwerk. Mikrovesikel werden dagegen als Reaktion auf Aktivierung direkt von der Plasmamembran abgespalten

und weisen eine Größe von 200 nm bis 1 Mm auf. Apoptotische Körper sind mit 1-4 Mm die größten vesikulären Strukturen.<sup>55</sup>

### **2.3.2. Rolle von miRNAs bei der interzellulären Kommunikation und ihre potenzielle Funktion als Biomarker oder Regulatoren kardiovaskulärer Pathomechanismen**

Grundlage für das große Potenzial, dass den zirkulierenden miRNAs im Hinblick auf Diagnostik und Ähnliches zugesprochen wird, sind ihre sehr stabilen Eigenschaften. Es konnte beobachtet werden, dass die Konzentration extrazellulärer miRNAs in Blutproben auch bei starken Temperaturschwankungen und Frost-Tauwechselbeanspruchung des Plasmas stabil bleibt.<sup>56</sup> Entscheidende Faktoren hierfür scheinen der vesikuläre Transport und die beschriebenen Proteinbindungen zu sein, da diese einen Schutz gegen den Abbau der miRNAs durch RNasen bieten.<sup>57</sup>

Gleichzeitig konnte in verschiedenen Studien belegt werden, dass die Konzentrationen zirkulierender miRNAs als Reaktion auf endo- oder exogene Veränderungen zum Teil stark schwanken, weshalb davon auszugehen ist, dass deren Ausschüttung durch Reize unterschiedlicher Art induziert oder inhibiert wird.<sup>58</sup> Weiterhin gibt es Hinweise, dass zirkulierende miRNAs nicht nur einseitig aus den Zellen exportiert werden, sondern im Gegenteil auch mit Hilfe verschiedener Mechanismen importiert werden. Dies suggeriert, dass miRNAs endokrine Signal- oder Botenfunktionen erfüllen und möglicherweise sogar auch in den Zielzellen eine aktive Regulationsfunktion übernehmen.<sup>6</sup>

Diese Erkenntnisse sind Anlass für die Untersuchung, die im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführt wurde. Es lässt sich annehmen, dass sich auch OSAS-typische, nächtliche Apnoe- oder Hypopnoephasen in der Zusammensetzung der zirkulierenden miRNAs in irgendeiner Form niederschlagen. Es gibt bereits Beispiele für Studien in anderen Kontexten, die einen Einfluss von Hypoxien auf die miRNA-Ausschüttung belegen, etwa bei Kardiomyozyten, die unter Hypoxiebedingungen kultiviert wurden.<sup>59</sup> Daher erscheint es sinnvoll, diesen Zusammenhang auch im Hinblick auf OSAS-Patienten mit Phasen nächtlicher Hypoxien zu überprüfen. In den Versuchen der Arbeitsgruppe um Santamaria-Martos et al. konnten signifikante Unterschiede in der zirkulierenden miRNA-Expression bei OSAS-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe dargestellt werden.<sup>60</sup> Ein analytischer Vergleich der morgendlichen und abendlichen Expression zirkulierender miRNAs bei OSAS-Patienten wurde bisher noch nicht untersucht, weshalb wir die vorliegende Fragestellung gewählt haben. Das Ziel der vorliegenden Studie ist die Entwicklung eines tieferen Verständnisses der Vorgänge und der Zusammenhänge im Hinblick auf die miRNA-Ausschüttung bei OSAS-Patienten. Langfristig könnten miRNAs dadurch eine Möglichkeit der ergänzenden OSAS-Diagnostik darstellen. Zudem lassen sich durch miRNA-Bestimmungen zukünftig gegebenenfalls auch Aussagen zur kardiovaskulären Gefährdung der jeweiligen Patienten

treffen, da es bereits verschiedene Hinweise für derartige Zusammenhänge zwischen miRNA-Konzentrationsveränderungen und kardiovaskulären Pathologien gibt. Möglicherweise könnten zirkulierende miRNAs sogar selbst regulativ eingreifen und über verschiedene Mechanismen ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bewirken. Für diese Hypothesen und Fragen soll die vorliegende Studie im Folgenden Diskussionsansätze liefern.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. RNA-Isolation**

- Syn-Cel-miR-39; Artikel-Nr.: MSY0000010; Qiagen
- TRIzol Reagenz; Artikel-Nr.: 15596026; Thermo Fisher Scientific
- Chloroform; Artikel-Nr.: C2432-1L; Sigma
- NanoDrop; Thermo Fisher Scientific

##### **3.1.2. microRNA-Array**

- Taqman MicroRNA Reverse Transkription Kit, Artikel-Nr.: 4366596; Thermo Fisher Scientific
- Megaplex RT Primers Human Pool Av2.1, Artikel-Nr.: 4399966; Thermo Fisher Scientific
- Megaplex RT Primers Human Pool Bv3.0, Artikel-Nr.: 4444281; Thermo Fisher Scientific
- Megaplex Preamp Primer, Pool A v2.1 Mensch; Artikel-Nr.: 4399233; Thermo Fisher Scientific
- Megaplex Preamp Primer, Pool B v3.0 Mensch, Artikel-Nr.: 4444303; Thermo Fisher Scientific
- Taqman Preamp Mastermix; Artikel-Nr.: 4391128; Thermo Fisher Scientific
- Taqman Human MicroRNA Array Card Av2.0 + Array Card Bv3.0, Artikel-Nr.:4444913; Thermo Fisher Scientific
- Taqman Universal PCR MasterMix, No AmpErase UNG 2x Artikel-Nr.: 4364343; Thermo Fisher Scientific

##### **3.1.3. qPCR**

- Taqman MicroRNA Reverse Transkription Kit, Artikel-Nr.:4366597; Thermo Fisher Scientific
- Universal MasterMix II; Artikel-Nr.: 4440049; Thermo Fisher Scientific
- TaqMan Primer; Thermo Fisher Scientific
  - o Hsa-miR-133a: Assay ID: 002246
  - o Hsa-miR-505: Assay ID: 002087
  - o Hsa-miR-127: Assay ID: 000452
  - o Hsa-miR-181a: Assay ID: 000480
  - o Hsa-miR-145: Assay ID: 002278
  - o Syn-Cel-miR-39: Assay ID: 000200
- qPCR-Platten; Artikel-Nr.: 712260; Biozym

- 7900HT Thermo Cyclers, Applied Biosystems

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Allgemeine Probenvorbereitung und -verarbeitung**

#### **3.2.1.1. Rekrutierung und Probengewinnung**

Das Studiendesign wurde nach ausführlicher Prüfung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln von dieser genehmigt. Daraufhin wurden zunächst Probanden für die Durchführung der geplanten Studie rekrutiert. Die rekrutierten Probanden stammen aus dem Kollektiv der Schlafapnoepatienten, die ohnehin zu einer Polygraphie in der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikums Köln angemeldet waren. Nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung haben sie sich bereit erklärt, während Ihres geplanten Aufenthaltes zwei zusätzliche Blutproben zum Zweck dieser Studie abzugeben. Einschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie war das Vorhandensein bzw. der begründete Verdacht eines mindestens leichten OSAS, das heißt einem AHI von mindestens fünf. Ausgeschlossen wurden Patienten, die eine maßgebliche Beeinträchtigung der Nierenfunktion, schwere kardiale Erkrankungen oder Malignome hatten.<sup>7</sup>

Die venösen Blutabnahmen erfolgten zum einen vor der Nacht, also abends jeweils gegen 20:00 Uhr sowie am darauffolgenden Morgen gegen 8:30 Uhr. Abgenommen wurden jeweils 19,7 ml Blut in Form von einem Serum-Röhrchen (4,7 ml) und fünf Citratröhrchen (jeweils 3 ml).

#### **3.2.1.2. Probenverarbeitung**

Die Blutproben wurden nach Abnahme umgehend und unter ständiger Kühlung mit Eis weiterverarbeitet. Zunächst wurden die Blutproben zentrifugiert, um das Zellplasma zu isolieren. Das Zentrifugationsschema sah dabei wie folgt aus:

1. 15 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 3000 G
2. 15 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 2500 G
3. 15 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 2500 G

Zwischen den einzelnen Schritten wurden Sediment und Überstand jeweils getrennt. Das verbliebene Plasma bzw. Serum wurde in 1 ml Aliquots bei -80°C eingefroren, bevor es gesammelt im Labor des Universitätsklinikums Bonn weitergehend analysiert wurde.<sup>7</sup>

### **3.2.2. MicroRNA-Quantifizierung durch Microarray-Analyse zur Auswahl der zu untersuchenden miRNAs**

#### **3.2.2.1. RNA-Isolation in Vorbereitung auf die Array-Analyse**

Im ersten Schritt der weiterführenden Probenverarbeitung wurde zunächst eine RNA-Isolation durch eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung durchgeführt. Dazu wurde 250 µl Plasma in neue 1,5 ml-Tubes überführt, 750 µl Trizol Reagenz des Herstellers *Thermo Fisher Scientific* dazugegeben und die Probe 15s lang gevortext.

Nach einer Inkubation von fünf Minuten wurden 150 µl Chloroform des Herstellers *Sigma* hinzugegeben und die Probe erneut 15s gevortext. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute [rpm]) für 15 Minuten, was zu einer Phasentrennung geführt hat. Hierbei beinhaltete die obere, klare Phase RNA und musste von der Interphase und der unteren, organischen Phase vollständig getrennt und in ein weiteres 1,5 ml-Tube überführt werden. Im Anschluss wurde zu der isolierten oberen Phase im Verhältnis eins zu eins 100%-Isopropanol gegeben, wodurch es zu einer Ausfällung der RNA gekommen ist. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde folgte die Zentrifugation nach dem folgenden Schema:

1. 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm  
- im Anschluss: Verwerfen des Überstandes und Hinzufügen von 1 ml 75%-Ethanol
2. 5 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm  
- im Anschluss: Verwerfen des Überstandes und Hinzufügen von 1 ml 75%-Ethanol
3. 5 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm  
-im Anschluss: Verwerfen des Überstandes

Das verbleibende Pellet wurde ca. 30 Minuten getrocknet. Im Anschluss wurde es in 20-50 µl RNase-/DNase freiem Wasser gelöst und 10 Minuten lang bei 56 °C inkubiert, um die Löslichkeit der RNA im Wasser zu erhöhen. Danach wurde die RNA in Vorbereitung auf ihre weitere Verwendung auf Eis gestellt.<sup>7</sup>

#### **3.2.2.2. cDNA-Synthese durch Reverse Transkription in Vorbereitung auf die Array-Analyse**

Um vor der einzelnen Quantifizierung aller Proben einen Überblick über verschiedene, sich darstellende miRNAs in den ersten Proben zu erhalten, wurde im Vorfeld ein Taqman-miRNA-Array durchgeführt. Ziel dessen war die Entscheidung darüber, welche miRNAs besonders für eine Quantifizierung im Rahmen dieser Studie geeignet sein könnten und welche miRNAs das größte Potenzial für detektierbare Differenzen in morgendlichen und abendlichen Proben bieten könnten. Im Ganzen wurden dabei abendliche sowie morgendliche Proben von fünf

Patienten auf die Expression von verschiedenen miRNAs verglichen. Verwendet wurde das Taqman-Array-microRNA-Kartenset A + B der Firma *Thermo Fisher Scientific*. Für jede Probe musste dabei jeweils ein Reaktionsansatz für Karte A und Karte B gefertigt werden.

Im ersten Schritt wurde für jede Probe jeweils ein Reaktionsansatz für Karte A und Karte B gefertigt, mit dem durch Reverse Transkription (RT) zunächst komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary desoxyribonucleic acid [cDNA]) synthetisiert wurde. Für den Reaktionsansatz wurden 3 µl RNA einer Konzentration von 30 ng/µl mit 4,5 µl MasterMix gemischt. Der Mastermix wurde nach **Tabelle 1** angesetzt.<sup>7</sup>

<b>Mastermix</b>	<b>µl/sample</b>	<b>x11</b>
100 mM dNTP mit dTTP	0,2	2,2
10x Megaplex RT Primer Pool A bzw. Pool B	0,8	8,8
Multiscribe Reverse Transcriptase 50 u/µl	1,5	16,5
10xRT Buffer	0,8	8,8
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0,9	9,9
RNase Inhibitor 20 u/µl	0,1	1,1
Rnase free water	0,2	2,2
<b>Total</b>	<b>4,5</b>	<b>49,5</b>

**Tabelle 1** - Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkription, Microarray-Analyse.

Dieser Ansatz wurde im Anschluss mehrmals invertiert, kurz abzentrifugiert und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde folgendes Cycler Programm – RT Megaplex absolviert:

1. 40 Zyklen
  - a. 2 min bei 16 °C
  - b. 1 min bei 42 °C
  - c. 1 s bei 50 °C
2. 5 min bei 85 °C
3. unbegrenzt bei 4 °C

### **3.2.2.3. Präamplifikation**

Da die zu untersuchenden microRNA nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, wurde außerdem eine Präamplifikation durchgeführt. Dafür wurde für Pool A und Pool B ein jeweils eigener weiterer Mastermix nach der **Tabelle 2** mit den entsprechenden Primer Pools angesetzt:



<b>Mastermix</b>	<b>µl/sample</b>
Preamp Mastermix 2x	12,5
Megaplex Preamp Primer A 10x/ B 10x	2,5
RNase free water	7,5
<b><u>Total</u></b>	<b><u>22,5</u></b>

**Table 2** - Zusammensetzung des Mastermix für die Präamplifikation, Microarray-Analyse.

Für die nächsten Schritte wurden 2,5 µl RT-Produkt mit 22,5 µl des Mastermix vermischt, mehrmals invertiert und dann abzentrifugiert. Danach wurde das Produkt fünf Minuten auf Eis inkubiert, bevor folgendes Preamp Megaplex Cycler Programm durchlaufen wurde:

1. 10 min bei 95 °C
2. 2 min bei 55 °C
3. 2 min bei 72 °C
4. 12 Zyklen
  - a. 15 s bei 95 °C
  - b. 4 min bei 60 °C
5. 10 min bei 99 °C
6. Unbegrenzt bei 4 °C

Pro Probe wurden zuletzt noch 75 µl 0,1x TG-Puffer hinzugefügt. Eine Lagerung war im Anschluss für maximal sieben Tage bei einer Temperatur von -20° C möglich.<sup>7</sup>

#### **3.2.2.4. Micro Fluidic Cards Analyse**

Um nun eine Quantifizierung per Microarray vorzunehmen, wurde mit dem in den vorangegangenen Schritten produzierten Reverse-Transkriptase-Produkt erneut ein Mastermix angesetzt. Die Zusammensetzung erfolgte nach der **Table 3**.

<b>Mastermix</b>	<b>µL</b>
Taqman universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG 2X	450
Megaplex RT Produkt (vorher 6x invertieren)	9
Nuclease-free Water	441
<b><u>Total</u></b>	<b><u>900</u></b>

**Table 3** - Zusammensetzung des Mastermix für die Micro Fluidic Cards Analyse.

Die gewonnene Mischung wurde nun in die jeweilige Micro fluidic Card A und B des Taqman Array MicroRNA-Karten-Set pipettiert. Im Anschluss wurde eine Zentrifugation bei 1000 rpm für eine Minute durchgeführt. Zur quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (quantitative

Polymerase Chain Reaction [qPCR]) wurde ein 7900HT-Thermocycler der Firma *Applied Biosystems* verwendet.<sup>7</sup>

### **3.2.2.5. Statistische Auswertung der Array-Analyse**

Die Analyse der Daten erfolgte mithilfe der Expression Suite V1.1 Software von *Applied Biosystems*. Die Cycle Threshold (Ct) Werte der qPCR wurden im Anschluss mithilfe von *Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Albuquerque, NM, USA)* weiterverarbeitet. Ct-Werte über 40 wurden als „nicht nachweisbar“ definiert. Als Housekeeping-Gen zur endogenen Kontrolle wurde aufgrund der stabilen Expression in allen Proben U6snRNA ausgewählt.<sup>7</sup>

Die angeschlossene weiterführende Analyse der Werte wurde mit *GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)* durchgeführt. Durchgeführt wurde dabei der Dunn-Bonferroni-Test für multiple Vergleiche.<sup>7</sup>

### **3.2.3. Einzelne MicroRNA-Quantifizierung durch qPCR**

#### **3.2.3.1. RNA-Isolation in Vorbereitung auf die qPCR**

Um vor der qPCR-Analyse die RNA zu isolieren, wurde erneut eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung durchgeführt (siehe 3.2.2.1). Zur exogenen Kontrolle der Messergebnisse wurden zusätzlich 5 µl synthetisch hergestellte 1µM-Syn-Cel-miR-39 des Herstellers *Qiagen* hinzugefügt und die Mischung erneut gevortext. Diese microRNA ist im menschlichen Genom nicht vorhanden, sondern wurde ursprünglich aus dem *Caenorhabditis elegans* isoliert, weshalb sie sich in diesem Kontext ideal zur exogenen Kontrolle eignet.<sup>56</sup>

Nach einer Zentrifugation bei 4° und 13.000 rpm für 15 Minuten ist es zu einer Phasentrennung gekommen, wobei die obere, klare Phase isoliert wurde und im Verhältnis eins zu eins mit 100%-Isopropanol vermischt wurde. Dies bewirkt eine Ausfällung der RNA. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde folgte die Zentrifugation nach dem folgenden Schema:

1. 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm  
- im Anschluss: Verwerfen des Überstandes und Hinzufügen von 1 ml 75%-Ethanol
2. 5 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm  
- im Anschluss: Verwerfen des Überstandes und Hinzufügen von 1 ml 75%-Ethanol
3. 5 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm  
-im Anschluss: Verwerfen des Überstandes

Nach einer Trocknungszeit von 30 Minuten wurde das RNA-Pellet in 20-50 µl RNase-/DNase freiem Wasser gelöst und 10 Minuten lang bei 56 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Messung der RNA-Konzentration über NanoDrop der Firma *Thermo Fisher Scientific*.<sup>7</sup>

### 3.2.3.2. cDNA-Synthese durch Reverse Transkription in Vorbereitung auf die qPCR

Vor der einzelnen Quantifizierung der microRNA aller gesammelten Proben durch qPCR wurde die isolierte RNA erneut durch Reverse Transkription in cDNA umgewandelt. Für die Reverse Transkription wurde das *Taqman microRNA Kit zur Reversen Transkription* von *Thermo Fisher Scientific* verwendet. Dabei wurde die isolierte RNA zunächst auf 2 ng/µl verdünnt. Pro Reaktionsansatz, der für jede zu untersuchende miRNA einzeln angesetzt werden musste, wurden dann insgesamt 10 ng RNA benötigt, was in dem Falle 5 µl der verdünnten RNA-Lösung entsprach. Jeder dieser Ansätze war dann jeweils mit 10 µl eines Reverse-Transkriptase-Reaktions-Mastermix zu versetzen, der nach **Tabelle 4** angesetzt wurde.

Mastermix-Ansatz für 20x RT-Primer	µl/sample
100 mM dNTP	0,15
Multiscribe Reverse Transcriptase 50 u/µl	1
10x RT Buffer	1,5
RNase Inhibitor 20 u/µl	0,19
RNase-free Water	6,41
20x RT-Primer (von <i>ThermoFisher Scientific</i> )	0,75
<b>Total</b>	<b>10</b>

**Tabelle 4** - Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkription, qPCR.

Das Gesamtvolumen des Ansatzes pro miRNA-Probe war damit 15 µl. Im Folgenden wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert und durchlief dann das RT Cyclor Programm nach dem folgenden Schema:

1. *RT*-
  - i. 30 min bei 16 °C
  - ii. 30 min bei 42 °C
2. *Stop Reaction* - 5 min bei 85 °C
3. *Hold* - bei 4 °C

Danach wurde die entstandene cDNA entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C eingelagert.<sup>7</sup>

### 3.2.3.3. Real-Time-PCR

Zur Quantifizierung der cDNA wurde im letzten Schritt eine qPCR durchgeführt. Verwendet wurde dabei der *Applied Biosystems 7900HT Thermocycler*. Dazu wurde ein Ansatz nach **Tabelle 5** zusammengestellt.

	<b>µl/sample</b>
Universal MasterMix II (von <i>ThermoFisher Scientific</i> )	10
cDNA (RT-Produkt)	1
20x TaqMan Primer (von <i>ThermoFisher Scientific</i> )	1
Nuclease-free Water	8
<b>Total</b>	<b>20</b>

**Tabelle 5** - Zusammensetzung des Mastermix für die qPCR.

Es wurden qPCR-Platten vom Hersteller *Biozym* verwendet. Das qPCR-Programm wurde im Anschluss nach dem folgenden Schema durchlaufen:

1. 2 min bei 50 °C
2. 10 min bei 95 °C
3. 15 s bei 95 °C - 40 Zyklen
4. 1 min bei 60 °C - 40 Zyklen

Bei allen Patienten einzeln, wie beschrieben, mittels qPCR quantifiziert wurden miR-127, miR-133a, miR-145, miR-181a und miR-505.<sup>7</sup>

#### **3.2.3.4. Statistische Auswertung der qPCR**

Die anschließende Datenanalyse wurde unter Nutzung der delta-delta-Ct-Methode durchgeführt, wobei CT-Werte über 40 als „nicht nachweisbar“ definiert wurden. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte weiterhin unter Nutzung von GraphPad Prism 7. Unter der Annahme, dass die Ergebnisse des Patientenkollektivs in Normalverteilung vorliegen, wurden zunächst die vorliegenden miRNA-Konzentrationen miteinander verglichen und Ausreißer mit dem Ausreißer-Test nach Grubbs (Outlier-Test Prism 8 bzw. ESD-Test) isoliert und für die anschließenden Berechnungen ausgegliedert. Im zweiten Schritt wurden beide Gruppen, also abendliche und morgendliche Proben, miteinander verglichen. Grundlage war hier die Frage, ob es signifikante Unterschiede zwischen beiden gibt. Dies wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Test berechnet. Ein p-Wert < 0.05 wurde dabei als signifikant gewertet. Der Standardfehler wurde in den Graphen durch die Fehlerbalken angezeigt.<sup>7</sup>

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Klinische Patientencharakteristik

Insgesamt wurden 23 OSAS-Patienten für die Studie rekrutiert. Von diesen Patienten wiesen allerdings nur 22 Patienten in der Polygraphie einen AHI-Wert mindestens fünf auf, was ihren Einschluss in das Studienkollektiv erlaubte. Im Einzelnen zeigte sich bei den meisten Probanden ein als schwerwiegend einzuschätzendes OSAS (siehe **Tabelle 6**).<sup>7</sup>

OSAS – Schweregrad	Probandenanzahl Studienkollektiv
Mild	4 (36,4%)
Mittelgradig	8 (36,4%)
Schwer	10 (45,6%)

**Tabelle 6** - OSAS-Schweregradeinteilung des Patientenkollektiv.  
(in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup>

Von den 22 Patienten aus dem Studienkollektiv waren 19 männlich und drei weiblich (siehe **Tabelle 7**). Das durchschnittliche Patientenalter betrug 44,45 Jahre, wobei der jüngste Patient 28 und der älteste 71 Jahre alt war. Knapp 70% der Patienten waren im Alter zwischen 35 und 55 Jahren. Die AHI-Werte der Probanden lagen durchschnittlich bei 28,38; der Median lag bei 24. Dies würde einer mittelgradigen OSAS-Ausprägung entsprechen.<sup>11</sup> Der durchschnittliche BMI betrug 28,68, was einer Präadipositas entspricht. Sieben Patienten hatten einen BMI von über 30, womit sie als adipös einzustufen wären. Vier Patienten hatten einen BMI, der sie als normalgewichtig einstuft. Der Median des nächtlichen Sauerstoffsättigungsindex (Oxygen Desaturation Index [ODI]) der Probanden lag bei 21,7/h und die niedrigste Sauerstoffsättigung insgesamt lag bei 79,1%.<sup>7</sup>

	Männlich	Weiblich	Gesamt
<b>Studienkollektiv</b>	19 (86%)	3 (14%)	22
<b>Alter - Durchschnitt</b>	46,3 Jahre	44,2 Jahre	44,5 Jahre
<b>BMI - Durchschnitt</b>	30,2	28,4	28,7
<b>ESS - Durchschnitt</b>	15,5	9	10,1
<b>AHI - Durchschnitt</b>	27,5 /h	28,5 /h	28,3 /h

**Tabelle 7** - Übersicht klinische Daten des Patientenkollektiv.  
(in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup>

Im Hinblick auf zusätzliche kardiovaskuläre Risiken war festzustellen, dass vier der Probanden regelmäßige Raucher waren. Außerdem lag bei sechs Probanden eine diagnostizierte Hypertonie unter Behandlung vor. Bei einem der Patienten war im Vorfeld bereits eine koronare Herzerkrankung diagnostiziert worden und bei einem Weiteren eine periphere arterielle Verschlusskrankheit. Fünf der Patienten wurden im Vorfeld außerdem bereits mit

einer CPAP-Maske therapiert, die in den meisten Fällen unzureichend toleriert wurde oder aus anderen Gründen unzureichend zufriedenstellend war.<sup>7</sup>

#### 4.2. Detektierbare miRNAs

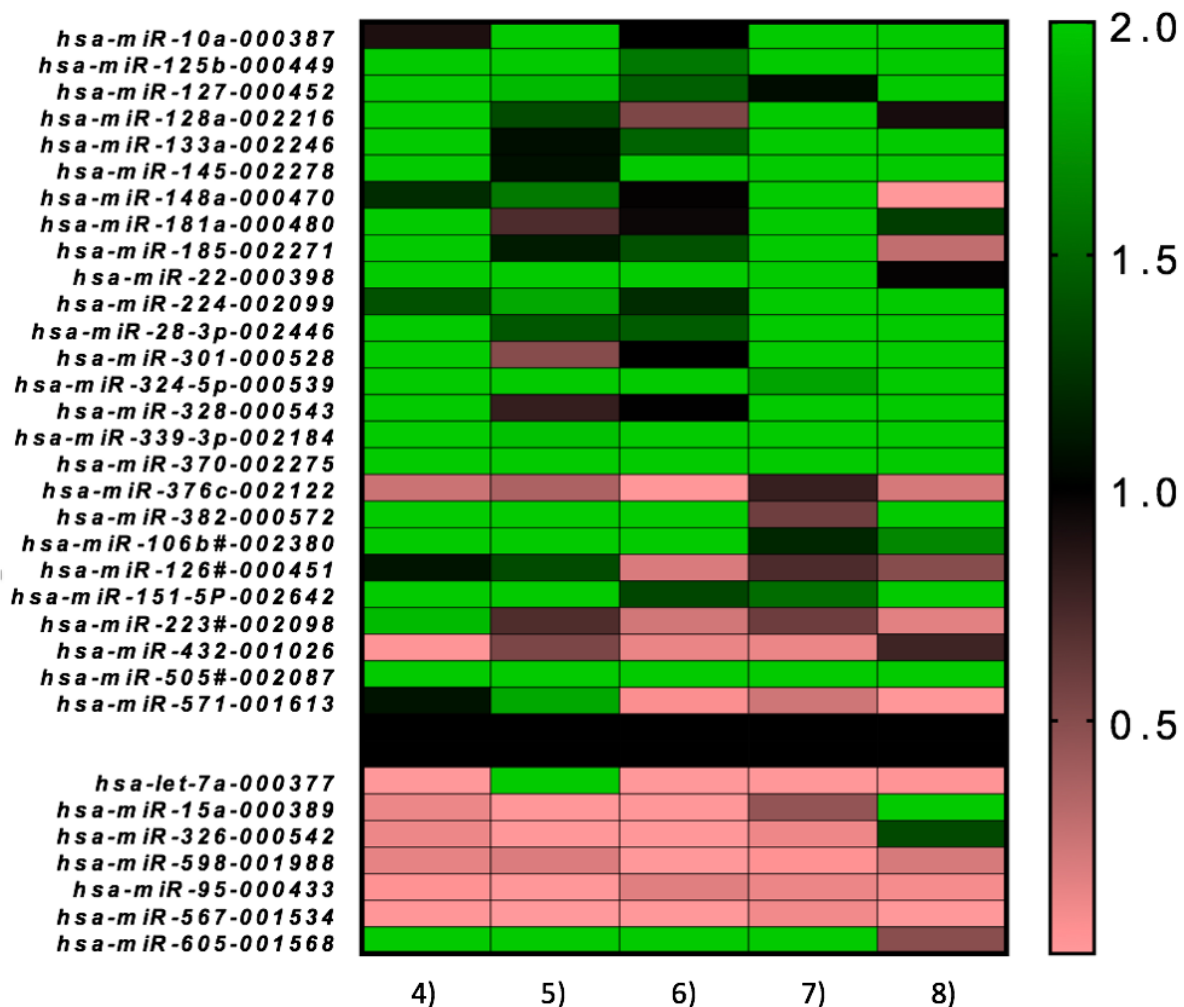
Zunächst wurde in einem Microarray-basierten Verfahren geprüft, welche miRNAs gut detektierbar sind und möglichst stark reguliert werden. Dazu wurde die miRNA-Expression von fünf Probanden verglichen, namentlich der Patienten 4) bis 8). Bei den abendlichen und morgendlichen Proben wurde jeweils eine relative Quantifizierung vorgenommen, die die Veränderung im zeitlichen Verlauf abgebildet hat.<sup>7</sup>

Insgesamt ist festzustellen, dass sich bei vielen der untersuchten miRNAs Konzentrationsveränderungen im Vergleich zwischen abendlichen und morgendlichen Proben zeigen. Dabei kann zum Teil eine verstärkte Expression am Morgen beobachtet werden, die sich grafisch im Array als Vielfache der abendlichen Referenz-Konzentration darstellen und Fold-Change-Werte zwischen 1.0 und 2.0 aufweisen (siehe **Abbildung 1**).

Unter den verstärkt exprimierten miRNAs fällt vor allem miR-505 auf, die bei allen fünf Patienten ein auffällig homogenes Vervielfältigungsmuster zeigt, dass sich in einem Fold-Change von näherungsweise 2 darstellen lässt. Dies ist als statistisch signifikante Steigerung morgendlicher miRNA-Konzentrationen zu bewerten. Weiterhin heraufreguliert und verstärkt exprimiert, allerdings in keinem signifikanten Maße, sind unter anderem die miR-127, miR-133a, miR-145 und miR-181a. Im Einzelnen zeigt sich bei miR-127 in den Proben der Patienten 4), 5), 6) und 8) eine Vervielfältigung, die einem Fold-Change  $> 1.0$  entspricht. In der Probe des Patienten 7) ist hier allerdings keine Konzentrationsveränderung zu zeigen. Weiterhin zeigt sich bei miR-133a bei den Patienten 4), 6), 7) und 8) erneut eine Vervielfältigung mit einem Fold-Change  $> 1.0$ . In diesem Fall ist bei der Probe von Patient 5) keine deutliche Veränderung festzustellen, was in einem Fold-Change = 1 resultiert. Für miR-145 lassen sich bei den Patienten 4), 6), 7) und 8) ebenso deutliche Konzentrationszuwächse ermitteln, was dementsprechend ebenso einem Fold-Change  $> 1$  entspricht. Auch hier lässt sich bei der Probe von Patient 5) keine signifikante Konzentrationsveränderung darstellen. Für miR-181a lässt sich beobachten, dass es hier bei den Patienten 4), 7) und 8) erneut zu einer Konzentrationsvervielfältigung mit einem Fold-Change-Wert  $>1$  kommt. Eine verminderte Expression zeigt sich dagegen bei der gleichen miRNA bei Patient 5), während bei Patient 6) keine Konzentrationsänderung messbar ist.<sup>7</sup>

Es zeigen sich auch miRNAs, die im Vergleich abendlicher und morgendlicher Konzentrationen herabreguliert wurden. Hier zu nennen sind unter anderem miR-598, miR-326 und miR-432, die morgens in signifikant verringerter Konzentration zu detektieren sind. miR-598 weist bei allen Patienten durchgängig einen Fold-Change  $< 0,5$  auf. miR-326 dagegen weist nur bei Patienten 4) bis 7) einen Fold-Change  $< 0,5$  auf, während bei Patient 8) eine gesteigerte Konzentration, entsprechend einem Fold-Change = 1,5, messbar ist. Bei

miR-432 sind nur bei den Patienten 4), 6) und 7) deutliche Konzentrationsverminderungen im Sinne eines Fold-Change < 0,5 messbar, während bei den Patienten 5) und 8) kaum Veränderungen morgendlicher und abendlicher Konzentrationen darstellbar sind.<sup>7</sup>



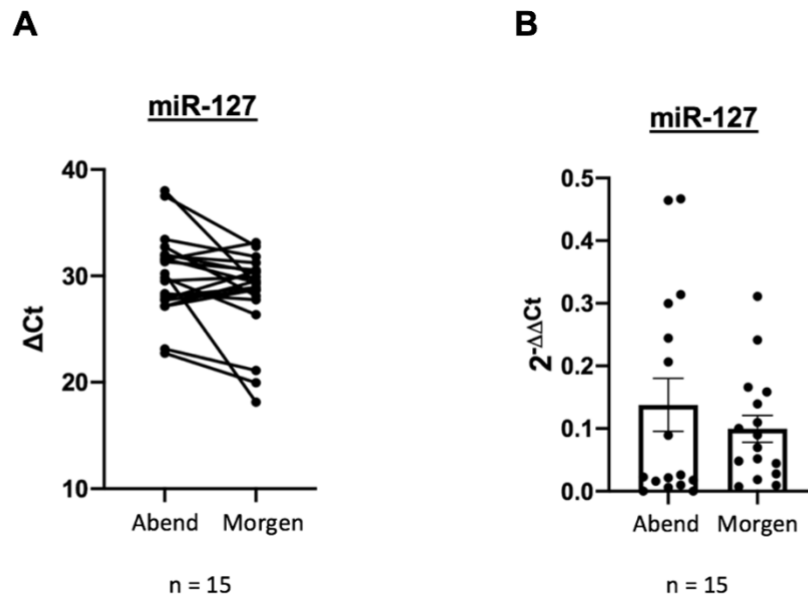
**Abbildung 1** - Relative miRNA-Quantifizierung, Microarray der Patientenproben 4)-8). (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup>

Die Ergebnisse dieser Untersuchung stellen die Entscheidungsgrundlage für die Auswahl der später in der qPCR einzeln zu quantifizierenden miRNAs dar. Bei der Entscheidung, welche der miRNAs weitergehend untersucht werden sollten, fließt auch die Tatsache mit ein, dass bestimmte miRNAs im wissenschaftlichen Kontext bereits relativ bekannt sind und sich daher eine relativ große Datenbasis zu Vergleichszwecken heranziehen lässt. In der qPCR weitergehend untersucht wurden daher die folgenden miRNAs: miR-127, miR-133a, miR-145, miR-181a, miR-505.<sup>7</sup>

### 4.3. Nächtliche miRNA -Konzentrationsunterschiede

Im nächsten Schritt der Analyse wurde eine absolute Quantifizierung der miRNAs mittels qPCR durchgeführt. Die Ergebnisse ermöglichen einen direkten Vergleich einzelner miRNA-Konzentrationen in morgendlichen und abendlichen Proben, bezogen auf die individuellen

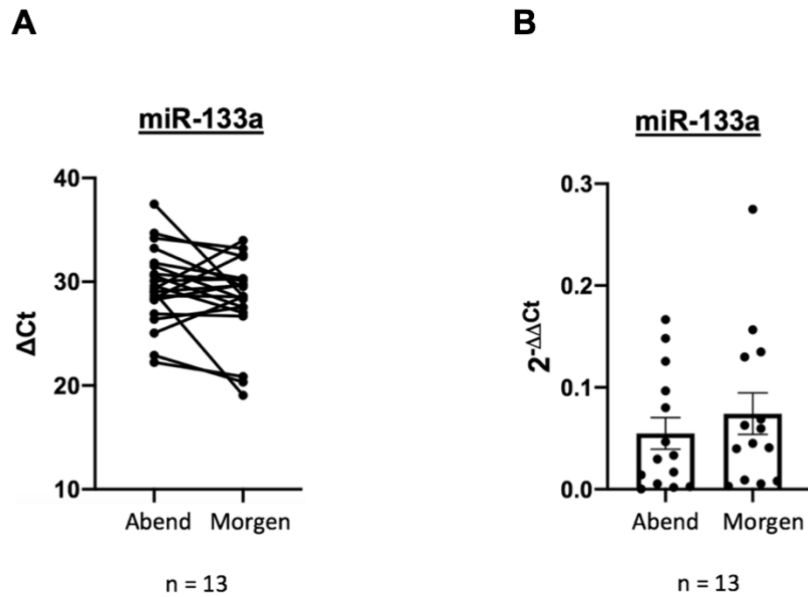
Probanden oder auch bezogen auf das Patientenkollektiv als Ganzes. Die messbaren Differenzen morgendlicher und abendlicher Proben weisen zum Teil große Unterschiede auf. Allerdings zeigen sich auch in der Detektierbarkeit der einzelnen miRNAs in den Proben große Unterschiede, wodurch sich die Anzahl (n) der gemessenen Ergebnisse, die im Rahmen dieser Studie für die einzelnen miRNAs jeweils analysiert werden, erheblich unterscheidet.<sup>7</sup>



**Abbildung 2** - qPCR-Ergebnisse von miR-127. **A:** Individuelle nächtliche Veränderungen der Ct-Werte. **B:** Relative miRNA-Expression  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup>

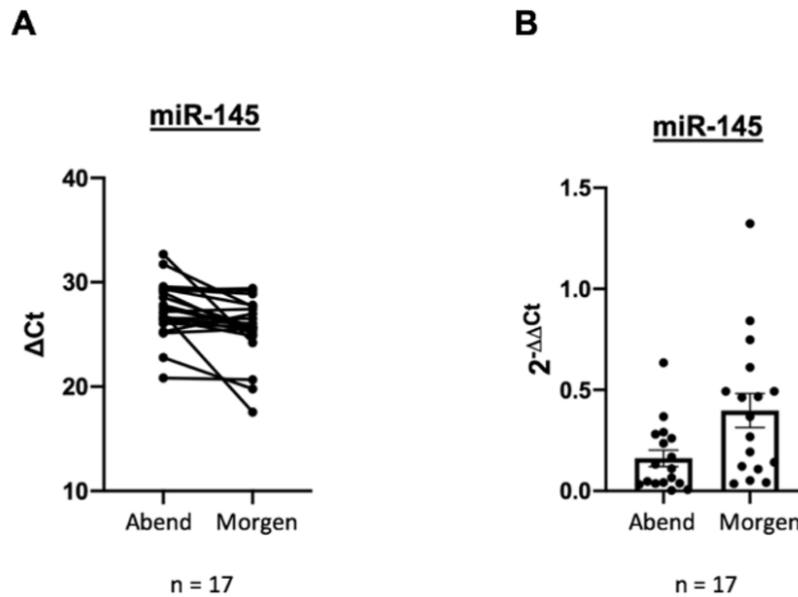
Die Ergebnisse im Einzelnen lauten wie folgt: miR-127 konnte in hinreichender Menge in den Proben von 15 Probanden isoliert werden (siehe **Abbildung 2**). Die Höhe der Differenz der Ct-Werte von abendlichen und morgendlichen Messungen unterschieden sich zwischen den einzelnen Probanden zum Teil sehr stark. Ein maximaler Anstieg der Konzentration zeigt sich bei Proband 6), bei dem die Ct-Werte abends und morgens eine Differenz von -8,85 aufweisen. Bei Proband 22) zeigt sich bezogen auf miR-127 der größte Konzentrationsabfall, der sich in einer berechneten Ct-Differenz von 2,51 niederschlägt. Der Mittelwert der Ct-Differenzen zwischen abendlichen und morgendlichen Proben von miR-127 aller Patienten beläuft sich auf -1,21, was einem durchschnittlichen Konzentrationszugewinn von miR-127 entspricht, also einer verstärkten morgendlichen Expression. Der Mann-Whitney-U-Test, der in diesem Fall untersucht, ob sich die Werte der abendlichen Proben statistisch signifikant von den morgendlichen Werten unterscheiden, konnte allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zeigen. Die exakte Signifikanz betrug nach SPSS-Berechnungen 0,44, weshalb die Nullhypothese, die besagt, dass keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestehen, bei einem Signifikanzniveau von 0,050 nicht abgelehnt werden kann.<sup>7</sup>





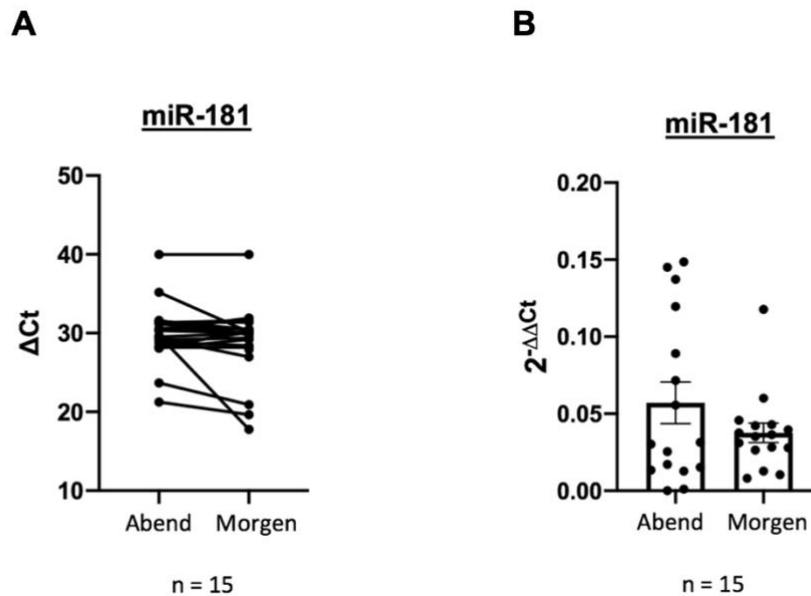
**Abbildung 3** - qPCR-Ergebnisse von miR-133a. **A:** Individuelle nächtliche Veränderungen der Ct-Werte. **B:** Relative miRNA-Expression  $\pm$  SEM. (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup>

Im Gegensatz dazu konnte miR-133a nur in den Proben von 13 Probanden isoliert werden (siehe **Abbildung 3**). Im Vergleich morgendlicher und abendlicher Werte stellt man fest, dass es hier durchschnittlich zu einer vermehrten morgendlichen Expression kommt, was sich in einer mittleren Ct-Differenz von -0,73 niederschlägt. Allerdings ist die Tendenz auch hier nicht ganz eindeutig und die Werte schwanken relativ stark. Auch hier lassen sich sowohl Konzentrationssteigerungen bei einigen Probanden als auch Konzentrationsverminderungen im Verlauf der Nacht bei anderen Probanden beobachten. Ein maximaler Konzentrationsanstieg zeigte sich bei Proband 16), mit einer Differenz morgendlicher und abendlicher Ct-Werte von -8,95. Bei Proband 17) zeigte sich dagegen die maximale Konzentrationsminderung in Bezug auf miR-133a. Hier betrug die Differenz beider Ct-Werte 4,54. Die Unterschiede der Konzentrationen von miR-133 in morgendlichen und abendlichen Proben können erneut nicht als signifikant angesehen werden, da sich die exakte Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test auf 0,55 beläuft, weshalb die Nullhypothese bei einem Signifikanzniveau von 0,050 nicht abgelehnt werden kann.<sup>7</sup>



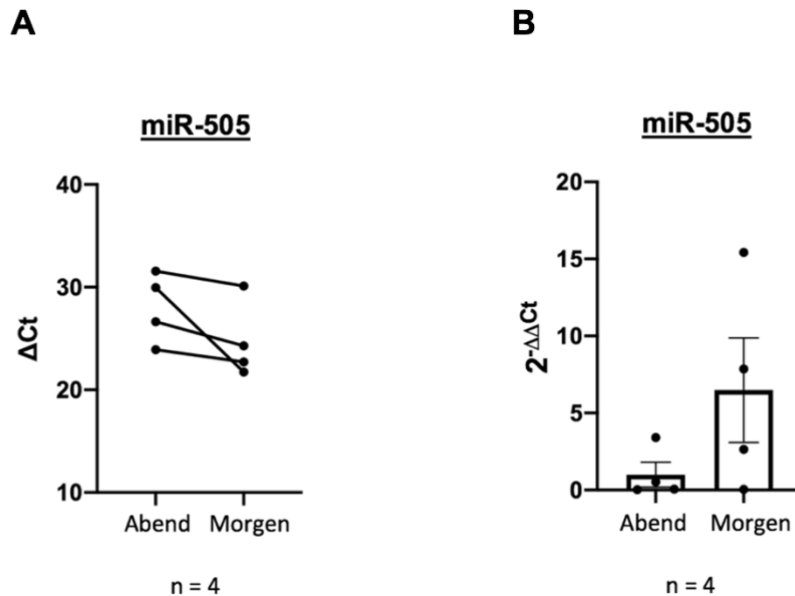
**Abbildung 4** - qPCR-Ergebnisse von miR-145. **A:** Individuelle nächtliche Veränderungen der Ct-Werte. **B:** Relative miRNA-Expression  $\pm$  SEM. (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup>

miR-145 konnte in hinreichender Menge in den Proben von 17 Probanden gefunden werden (siehe **Abbildung 4**). In wenigen Fällen ist hier ein Konzentrationsabfall zu beobachten. Dieser ist maximal bei Proband 22), bei dem eine Differenz der Ct-Werte von 1,59 messbar wird. In der Mehrzahl der Fälle kommt es allerdings zu einer Konzentrationssteigerung, die bei Proband 20) mit einer Differenz der Ct-Werte von -8,64 einen Höchstwert erreicht. Im Durchschnitt liegen die Differenzen der morgendlichen und abendlichen Ct-Werte bei -1,64, was einer mittleren Konzentrationssteigerung entspricht. Dieser messbare Unterschied der miR-145-Konzentrationen im Vergleich zwischen morgendlichen und abendlichen Messungen kann mithilfe des Man-Whitney-U-Tests als signifikant bestätigt werden. Die exakte Signifikanz liegt in diesem Fall bei 0,02, womit sie unterhalb des Signifikanzniveaus von 0,050 liegt.<sup>7</sup>



**Abbildung 5** - qPCR-Ergebnisse von miR-181a. **A:** Individuelle nächtliche Veränderungen der Ct-Werte. **B:** Relative miRNA-Expression  $\pm$  SEM. (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup>

miR-181a konnte in den Proben von 15 Probanden isoliert werden (siehe **Abbildung 5**). In vielen Fällen waren bei der Analyse dieser miRNA nur geringe Unterschiede zwischen morgendlichen und abendlichen Proben feststellbar. Der Durchschnitt der miRNA-Differenzen morgendlicher und abendlicher Proben beläuft sich auf -0,86, was einem nächtlichen Konzentrationsanstieg entspricht. Der maximale, beobachtete Konzentrationsabfall zeigt sich erneut bei Patient 22), bei dem die Differenz morgendlicher und abendlicher Ct-Werte 3,09 beträgt. Der stärkste Konzentrationsanstieg zeigt sich auch wiederum erneut bei Proband 16), bei dem für miR-181a die Ct-Differenz -10,17 beträgt. Insgesamt kann hier aber von keiner Signifikanz ausgegangen werden, da im Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz von 0,71 berechnet wurde, was keine Ablehnung der Nullhypothese erlaubt.<sup>7</sup>



**Abbildung 6** - qPCR-Ergebnisse von miR-505. **A:** Individuelle nächtliche Veränderungen der Ct-Werte. **B:** Relative miRNA-Expression  $\pm$  SEM. (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup>

Die Isolation von miR-505 war in einer Vielzahl der Proben nicht möglich (siehe **Abbildung 6**). Eine Auswertung ist daher nur begrenzt möglich und bietet vermutlich einen geringen Informationsgewinn. Letztendlich konnten nur vier Probanden im Hinblick auf die miR-505-Expression ausgewertet werden. Es zeigt sich bei allen Proben ein nächtlicher Konzentrationsanstieg. Dieser ist maximal bei Proband 1), bei dem die Differenz der Ct-Werte -8,43 beträgt. Durchschnittlich liegt dieser Wert für miR-505 bei -3,23. Aufgrund der geringen Anzahl auswertbarer Proben sind diese Ergebnisse ebenfalls nicht als signifikant zu bewerten. Die im Mann-Whitney-U-Test berechnete exakte Signifikanz beträgt 0,20, was unter dem Signifikanzniveau von 0,050 liegt, weshalb erneut an der Nullhypothese festgehalten werden muss.<sup>7</sup>

## **5. Diskussion**

### **5.1. Interpretation von miRNA-Konzentrationsunterschieden in der vorliegenden Studie**

In der vorliegenden Studie konnten zum Teil signifikante Konzentrationsveränderungen von zirkulierenden miRNAs nach nächtlich auftretender OSAS-Symptomatik festgestellt werden. Es gilt nun im Einzelnen herauszufinden, wie dies im Zusammenhang mit dem erhöhten kardiovaskulären Risiko von OSAS-Patienten steht, wie diese Erkenntnisse im breiteren wissenschaftlichen Kontext zu interpretieren und einzuordnen sind und welche Erklärungsansätze oder aber auch Anwendungsansätze sich hieraus ableiten lassen könnten. Dabei sollte diese Studie nicht isoliert betrachtet werden, sondern möglichst weitere ergänzende Studien zu dieser Fragestellung nach sich ziehen. Die Interpretation dieser Ergebnisse bietet die Chance auf ein verbessertes Verständnis von regulatorischen Prozessen im Körper, in diesem Fall vor allem im Hinblick auf den Zusammenhang von OSAS und endothelialen Veränderungen, die ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bewirken. Außerdem besteht die Hoffnung, dass sich aus diesen Erkenntnissen und Beobachtungen eine Vielzahl von möglichen Anwendungen ableitet, die beispielsweise der Diagnostik oder der Risikostratifikation dienen könnten.

Das maßgebliche Ergebnis der vorliegenden Studie ist die Feststellung eines signifikanten Konzentrationsunterschiedes zwischen morgendlich und abendlich gemessener zirkulierender miR-145. Der deutlich messbare Anstieg in der Konzentration dieser miRNA ist potenziell von großer Relevanz. Die Ergebnisse suggerieren, dass nächtliche OSAS-Symptome die Ausschüttung von endothelialen miRNAs unmittelbar und akut beeinflussen könnten.<sup>7</sup>

Diese Erkenntnis steht im Einklang mit Erkenntnissen aus vorangegangenen Studien, die allgemein zeigen, dass exogene oder endogene Einflüsse und pathologische Prozesse zum Teil sehr unterschiedliche Effekte auf die Konzentration zirkulierender miRNAs haben, indem deren Ausschüttung entweder gehemmt oder aber auch gefördert werden kann. Es haben sich hier wiederholt eine Vielzahl verschiedener miRNAs gezeigt, die unterschiedlich und zum Teil in Signatures gekoppelt reagieren und veränderlich sind.

Insbesondere Hypoxien oder Apnoen, die bei OSAS und damit auch in dieser Studie einen entscheidenden Faktor darstellen, haben in verschiedenen vorangegangenen Studien einen maßgeblichen Einfluss auf die Konzentration zirkulierender miRNAs im Allgemeinen und auf die Konzentration zirkulierender miR-145 im Speziellen gezeigt. Hier konnten also zum Teil sehr ähnliche Beobachtungen gemacht werden wie in der durchgeführten Studie.

Huangfu et al. konnten zum Beispiel feststellen, dass miR-145-Konzentrationen im Myokardinfarktgewebe verglichen mit gesundem Gewebe erhöht waren. Außerdem hat man hier im Rahmen der Studie H9c2-Zellen zum einen unter Hypoxie- und zum anderen unter

normalen Bedingungen kultiviert. Hier hat sich gezeigt, dass in den Zellen, die einer Hypoxie ausgesetzt waren, deutlich höhere miR-145-Konzentrationen messbar waren.<sup>59</sup> Da auch die OSAS-Patienten rezidivierenden nächtlichen Hypoxien ausgesetzt sind und im Anschluss daran erhöhte Konzentrationen zirkulierender miRNAs aufweisen, entsprechen sich die Ergebnisse beider Studien in ihrer Tendenz. Sowohl in unserer Studie als auch in der von Huangfu et al. ist ein Anstieg der miR-145-Expression nach Hypoxien zu beobachten.

Im Hinblick auf unsere eigene Fragestellung ebenfalls bedeutsam scheint die Studie von Eichhorn et al., die Veränderungen sowohl in der Mikrovesikel- als auch in der miRNA-Konzentration unter Hypoxie-Bedingungen untersucht hat. Hierbei wurden Mikropartikel-(MP-) und miRNA-Spiegel bei trainierten Apnoetauchern vor und nach einer maximalen Apnoephase untersucht. Als Ergebnis ließ sich hier feststellen, dass die Spiegel von MPs und endothelialen miRNAs durch die Hypoxiephase angestiegen sind. Die Konzentration von miR-126 war über den gemessenen Zeitraum von vier Stunden nach der Apnoephase konstant signifikant erhöht, während miR-26 nur nach 30 Minuten und nach vier Stunden signifikant erhöht war. miR-92 und miR-21 waren zwar auch erhöht, aber nicht signifikant.<sup>5</sup> Auch die Interpretation dieser Ergebnisse steht im Einklang mit unseren Ergebnissen. Sowohl bei OSAS als auch bei Apnoetauchern scheinen die Apnoephasen und die resultierende Hypoxie zu einer vermehrten miRNA-Ausschüttung zu führen, weshalb im Anschluss an die Phase erhöhte Konzentrationen zirkulierender miRNAs zu messen sind. Unterschiede zeigen sich dagegen in der Art der jeweils verstärkt exprimierten miRNAs. Dieser Unterschied lässt sich allerdings nur eingeschränkt interpretieren, da in der vorliegenden OSAS-Studie weder miR-126-, noch miR-26- oder miR-92-Konzentrationen im Einzelnen quantifiziert und gemessen wurden. Diesbezüglich können also keine stichhaltigen Aussagen getroffen werden. Ein genauerer Vergleich wird weiterhin durch die unterschiedlichen zeitlichen Dimensionen beider Studien erschwert. Zwar werden in beiden Fällen kurzfristige Reaktionen des Körpers betrachtet, im Fall unserer Studie wird aber nur einmalig morgens die Konzentration der miRNAs gemessen und mit der abendlichen verglichen. Diesem Konzept zugrunde liegt die Hoffnung, dass sich die Summe nächtlicher Veränderungen dadurch subakut darstellen lässt. Zu den minutiösen Konzentrationsveränderungen einzelner miRNAs lassen sich dagegen keine Aussagen treffen.

Auch die Arbeitsgruppe um Kochan-Jamrozy et al. hat den Zusammenhang zwischen Hypoxien und miRNA-Ausschüttung untersucht. Hier lag der Schwerpunkt zu einem größeren Maße auf der Dynamik der Sauerstoffentsättigung und Ziel war es, die miRNA-Expressionsveränderung nach prolongierten Hypoxiephasen mit denen nach zyklischen Hypoxiephasen zu vergleichen. Der gewählte Zyklus sah dabei eine Hypoxiephase über eine Stunde vor, auf die jeweils eine Reoxigenierungsphase von 36 Minuten folgte. Als Ergebnis ließ sich auch hier festhalten, dass eine Phase der Hypoxie einen erheblichen Einfluss auf

verschiedene miRNA-Konzentrationen hat. Allerdings war als weiteres wichtiges Ergebnis ebenfalls festzustellen, dass es erhebliche Unterschiede im Effekt der prolongierten und der zyklischen Hypoxie gibt und die miRNA-Signature, die durch zyklische Hypoxien induziert wird, deutlich von der durch prolongierte Hypoxien abzugrenzen ist.<sup>61</sup> Diese Studie ist für die Interpretation unserer Studie insofern von großer Bedeutung, da die Hypoxiephasen bei OSAS auch eher einem zyklischen Muster folgen und eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien, die zu einem größeren Maße den Einfluss prolongierter Hypoxien auf die Konzentration zirkulierender miRNAs untersuchen, daher vermutlich nur bedingt gegeben ist.

In jedem Fall rechtfertigen die Gesamtheit der Ergebnisse dieser Studien unsere Hypothese, dass Hypo- oder Apnoephasen bei OSAS-Patienten, eine veränderte miRNA-Ausschüttung bewirken könnten und insbesondere die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Huangfu et al. bestätigen unsere Ergebnisse auch von der inhaltlichen Tendenz, da auch sie bei Zellen unter hypoxischen Zuständen erhöhte miR-145-Konzentrationen messen konnten.<sup>59</sup>

## **5.2. Einfluss von miR-145 auf das kardiovaskuläre Risiko**

### **5.2.1. Kardiovaskuläres Risiko von OSAS-Patienten**

Die Untersuchung und tiefere Betrachtung dieser miRNA-Phänomene ist bei OSAS-Patienten von großer Bedeutung, da diese Krankheit aufgrund ihrer wachsenden Prävalenz und ihrer zum Teil schwerwiegenden Folgen und Implikationen für Mortalität und Morbidität zunehmend an Bedeutung gewinnt und zudem vermutlich immer noch stark unterdiagnostiziert ist. Ein genaueres Verständnis sowohl des Pathomechanismus von OSAS und der Gründe für die Erhöhung des kardiovaskulären Risikos dieser Patienten als auch der Wirkung und Bedeutung von miRNAs in diesem Kontext ist unbedingt von Nöten.

Für die Probanden dieser Studie, aber auch für OSAS-Patienten allgemein ergeben sich durch die Krankheit zum Teil schwerwiegende physische und psychische Konsequenzen. Erstes und auffälligstes Symptom der Patienten ist eine mehr oder weniger ausgeprägte Tagesmüdigkeit, diese führt zum Teil sogar zu eingeschränkter Fahrtüchtigkeit oder anderweitiger relevanter Einschränkungen im Alltag.<sup>32</sup> Langfristig von großer Relevanz für den Patienten ist vor allem das durch OSAS erhöhte kardiovaskuläre Risiko. Dieser Zusammenhang ist schon seit längerem bekannt, auch wenn der zugrunde liegende Pathomechanismus noch nicht endgültig in ganzer Vollständigkeit geklärt werden konnte. Dabei scheint OSAS auf verschiedene Art und Weise bei unterschiedlichen kardiovaskulären Pathologien und Symptomen Einfluss zu haben. Es gibt beispielsweise sowohl Studien, die im Hinblick auf KHK Zusammenhänge zu OSAS herstellen, als auch solche, die dies für Rhythmusstörungen und Kardiomyopathien belegen.

Bezüglich KHK konnte festgestellt werden, dass Patienten, die unter OSAS leiden, signifikant häufiger Schlaganfälle erleiden und dass das Risiko sogar proportional zum OSAS-

Schweregrad ansteigt. Dabei ist nichtsdestotrotz festzuhalten, dass das erhöhte Risiko bereits bei mildem OSAS zu beobachten ist und dass der Unterschied auch nach Angleichung anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren, wie BMI und Raucherstatus signifikant bleibt.<sup>62</sup> Weiterhin konnte belegt werden, dass es ebenso eine signifikante Korrelation zwischen Schweregrad des OSAS und dem bei Patienten gemessenen Volumen arteriosklerotischer Plaques gibt.<sup>63</sup> Zur Rolle von OSAS bei kardialen Rhythmusstörungen gibt es unter anderem Studien von Mehra et al., die belegen, dass OSAS-Patienten bei gleicher Ausgangslage eine viermal höhere relative Chance haben, Vorhofflimmern zu erleiden. Ebenso haben sie eine dreimal höhere relative Chance, Ventrikuläre Tachykardien zu entwickeln.<sup>64</sup> Es konnte hier sogar suggeriert werden, dass es eine zeitliche Korrelation zwischen Arrhythmien und Apnoen bzw. Hypopnoen gibt oder diese sogar durch entsprechende Atmungsmuster ausgelöst werden können: Im Vergleich zu Perioden normaler Atmung war die relative Chance von Arrhythmien im Zeitraum nach einer Apnoe oder Hypopnoe 18-fach erhöht.<sup>65</sup> In einer anderen Studie von Ng et al. konnte man nach einer Metaanalyse belegen, dass OSAS auch einen entscheidenden Faktor in Bezug auf die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit nach Therapie von Rhythmusstörungen darstellt. So war das Risiko eines Wiederauftretens des Vorhofflimmerns nach Katheter-Ablation bei OSAS-Patienten um 25% erhöht.<sup>66</sup>

Ähnliches gilt bei Patienten, die neben OSAS auch unter einer hypertrophen Kardiomyopathie leiden. Diese scheinen im Vergleich zu Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie ohne OSAS deutlich anfälliger für die Entwicklung von Vorhofflimmern zu sein.<sup>67</sup>

Der genaue Pathomechanismus der Erhöhung des kardiovaskulären Risikos bei OSAS-Patienten ist weiterhin nicht vollständig geklärt. Bisherige Erklärungsansätze beziehen sich vor allem auf die durch OSAS bedingte Entstehung bzw. Verstärkung einer bestehenden Hypertonie. Als Ursache kommen hier sowohl vaskuläre Mechanismen wie eine bei OSAS verringerte Stickstoffmonoxid- (Nitric Oxide [NO])- Ausschüttung<sup>68</sup> als auch neuronale Mechanismen wie die durch OSAS gesteigerte sympathische Aktivierung<sup>69</sup> in Betracht. Weiterhin kommt es durch OSAS zu erhöhten systemischen Inflammationswerten, was ebenfalls ein Faktor sein könnte, der zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko der Patienten beiträgt.<sup>70</sup>

### **5.2.2. Pathway-Signalling von miR-145**

Aufgrund der in der vorliegenden Studie beobachteten miR-145-Konzentrationserhöhung bei OSAS kann diskutiert werden, inwiefern die erhöhten miRNA-Konzentration gegebenenfalls eine Veränderung des kardiovaskulären Risikos der entsprechenden Patienten bewirken und erklären könnte. Denn man kann davon ausgehen, dass die miRNAs durch ihre Ausschüttung eine gewisse Signal- und Kommunikationsfunktion übernehmen. Dafür spricht, dass es nicht nur zu einer Abgabe von Vesikeln kommt, sondern auch zu einer Aufnahme von Vesikeln. Dies geschieht entweder über Phagozytose, Endozytose oder direkte Fusion mit der Zellmembran



der Zielzelle.<sup>6</sup> In Studien konnten verschiedenste Beispiele gefunden werden, durch die belegt werden konnte, dass miRNAs in den jeweiligen Empfängerzellen eine aktive biologische Funktion ausüben.<sup>4</sup> Dies geschieht vermutlich vornehmlich über eine Veränderung der Genexpression durch eine komplementäre Bindung der importierten miRNA an die zelluläre mRNA.<sup>6</sup> Zum Teil wirkt die miRNA an den Zielzellen aber auch über andere Mechanismen wie eine Aktivierung von toll-like-Rezeptoren, was in vivo beispielsweise zu einer veränderten Schmerzempfindung<sup>71</sup> und veränderten inflammatorischen Reaktionen<sup>72</sup> führen kann.

Daran schließt sich die Schlussfolgerung an, dass auch die durch die OSAS-Symptomatik hervorgerufenen Veränderungen im Muster zirkulierender miRNAs wiederum eine Änderung in verschiedenen Regelkreisläufen des Körpers bewirken und dadurch physiologische oder auch pathologische Prozesse beeinflussen könnten. Durch die Einflussnahme von miRNAs auf den Stoffwechsel und die Integrität verschiedener Organe und Organsysteme könnten miRNAs lokal definitiv eine entscheidende regulative Rolle innehaben und einen erheblichen Beitrag zur kardiovaskulären Gesundheit oder zum kardiovaskulären Risiko beitragen. Da in unserer Studie vor allem miR-145 mit einer signifikanten morgendlichen Konzentrationssteigerung im Vergleich zu abendlichen Messungen aufgefallen ist, bietet es sich zudem vor allem an zu überprüfen, ob in vergangenen Studien bereits Zusammenhänge zwischen kardiovaskulären Pathologien und miR-145-Konzentrationsveränderungen beobachtet werden konnten und welche Mechanismen und Pathways hier eine Rolle spielen könnten.<sup>7</sup>

Es konnte bereits vor einiger Zeit festgestellt werden, dass miR-145 die häufigste miRNA in den Gefäßwänden darstellt.<sup>73</sup> Hier scheint miR-145 eine wichtige regulatorische Funktion einzunehmen, die vor allem bei der Entstehung intimaler Hyperplasien zum Tragen kommt und damit auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung verschiedener kardiovaskulärer Pathologien wie Atherosklerose, Hypertonus und der Restenose von Stents spielt.<sup>73</sup>

Die Rolle, die miR-145 dabei in den verschiedenen Prozessen spielt, unterscheidet sich zum Teil erheblich.<sup>7</sup> Zum einen gibt es Studien, in denen hohe miR-145-Konzentrationen scheinbar pathologische Prozesse fördern und somit einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen. Dies ist exemplarisch in Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Caruso et al. der Fall. Hier konnte ein positiver Zusammenhang zwischen erhöhten miR-145-Konzentrationen und dem Bestehen einer pulmonalen Hypertonie festgestellt werden. Diesen Ergebnissen entsprechend konnte weiterhin auch gezeigt werden, dass die Inhibierung von miR-145 der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie entgegenwirkte.<sup>9</sup> Dieses Ergebnis unterstützt potenziell unsere ursprünglich zugrunde gelegte Hypothese, dass die aufgrund des OSAS erhöhten miR-145-Konzentrationen ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko vermitteln.

Zum Anderen gibt es aber auch Studien, deren Ergebnisse hohen miR-145-Konzentrationen eher einen kardioprotektiven Effekt zuschreiben: Die Arbeitsgruppe um Wang et al. konnte

beispielsweise beobachten, dass eine Überexpression von miR-145 Autophagie-Prozesse in der Zelle inhibiert und es zu einer verminderten Proliferation und Migration der glatten vaskulären Muskelzellen kommt. Diese Migration ist einer der Prozesse, die einer intimalen Hyperplasie zugrunde liegen.<sup>8</sup> Das heißt, in diesem Kontext erfüllt miR-145 eine vasoprotektive Funktion, indem sie diesen Prozess hemmt.

Des Weiteren scheint miR-145 auch in Form eines miRNA-Clusters in Kombination mit miR-143 erheblichen Einfluss auf die vaskuläre Funktion zu haben. Dieses Cluster scheint ebenfalls vor allem für die vaskulären, glatten Muskelzellen eine erhebliche Rolle zu spielen. Studien mit entsprechenden Knock-out-Mäusen zeigten eine verminderte Gefäßkontraktilität sowie spontane neointimale Läsionen der Arterien.<sup>74</sup> Diese Rolle der miRNA im Hinblick auf die Arteriosklerose kommt möglicherweise besonders dann zum Tragen, wenn es aufgrund von akutem oder chronischem vaskulären Stress zu einer verminderten Expression von miR-143 und -145 kommt und es in der Folge zu einer Destabilisierung der glatten vaskulären Muskelzellen kommt.<sup>75</sup>

Eine weitere Forschungsgruppe, die sich mit den Auswirkungen von miR-145 auf kardiovaskuläre Prozesse oder Pathologien beschäftigt hat, ist die um Li et al. Hier wurde der Einfluss von miR-145 auf das inflammatorische Reaktionsgeschehen bei Patienten mit metabolischem Syndrom untersucht und festgestellt, dass eine verstärkte miR-145-Expression in Makrophagen über eine Arf6-Inhibierung eine verminderte Ausschüttung von Interleukin- (IL)-1beta, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und IL-6 bewirkt hat und dadurch die inflammatorische Reaktion gehemmt hat.<sup>76</sup> Auch diese spielt allgemein eine erhebliche Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Pathologien, was erneut bedeuten würde, dass miR-145 hier protektiv wirkt, indem es eine Inhibierung der metabolischen Inflammationsreaktion bewirkt.

Diese Erkenntnisse werden durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Yuan et al. weiter bestätigt. Hier wird die Rolle von miR-145 bei der Entstehung ischämischer Myokardschädigungen untersucht. Es kann gezeigt werden, dass miR-145 auf das Infarktgeschehen vor allem über die Inhibition von Apoptose- und Inflammationsprozessen einwirkt. Dies scheint das Ergebnis einer direkten negativen Regulation von CD40 durch miR-145 zu sein.<sup>77</sup> Auch bei dieser Analyse wird miR-145 folglich eine eher kardioprotektive Wirkung zuteil.

Ebenfalls zu nennen sind hier die Ergebnisse diverser Forschungsgruppen, die die Rolle verschiedener miRNAs im Hinblick auf die Vermittlung von Endothelschädigung untersucht haben. Hierfür kommen wiederum verschiedene Mechanismen in Betracht, die unter anderem mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), endothelialer NO-Ausschüttung, Produktion reaktiver Sauerstoff-Radikale und der Regulation der endothelialen Inflammationsreaktion im Zusammenhang stehen.<sup>78</sup> Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um

Kohlstedt et al. zeigen beispielsweise, dass eine erhöhte miR-145-Expression zu einer verminderten Expression von Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) führt, was wiederum eher mit einem verringerten kardiovaskulären Risiko assoziiert wäre.<sup>79</sup> Boettger et al. identifizieren ACE ebenfalls als ein mögliches regulatorisches Zielmolekül von miR-145.<sup>74</sup> Allgemein ist davon auszugehen, dass auch weitere Elemente des RAAS durch miRNAs auf verschieden Weise reguliert werden.<sup>78</sup> Gesammelt suggerieren also auch diese Studien, „dass es durch eine verstärkte miR-145-Expression zu einem verminderten Maß endothelialer Dysfunktion kommen könnte, was mit einer Beeinflussung des Blutdruckes insgesamt Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko der betroffenen Patienten haben könnte.“<sup>78</sup>

Die große Anzahl dieser verschiedenen Studien zeigt, dass miR-145 über eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen in kardiovaskulär bzw. vaskulär bedeutsame Prozesse regulativ eingreift und hier zum Teil erheblichen Einfluss hat.

Bezogen auf diejenigen Ergebnisse, die miR-145 einen kardioprotektiven Charakter zuschreiben, würden sich die Ergebnisse unserer Studie möglicherweise so interpretieren lassen, dass durch die morgendlich erhöhten miRNA-Werte das kardiovaskuläre Risiko der Patienten gesenkt wird, was eher überraschend wäre und unserer ursprünglichen Hypothese, nämlich dass die miRNA-Konzentrationsveränderungen das kardiovaskuläre Risiko der OSAS-Patienten steigern, widersprechen würde. Das heißt, die erhöhten morgentlichen miR-145-Werte wären in diesem Fall nicht dazu geeignet, schlüssig eine Verbindung im Pathomechanismus zwischen OSAS und dem erhöhten kardiovaskulären Risiko der Patienten zu schaffen und diesen Zusammenhang zu erklären.

Eine gewisse Einschränkung in der Vergleichbarkeit zwischen unserer Studie und einigen der exemplarisch genannten Studien ergibt sich allerdings durch Unterschiede des untersuchten Materials. Li et al. beispielsweise haben Gewebeproben und zelluläre Konzentrationen in Makrophagen untersucht,<sup>76</sup> während wir die Konzentration zirkulierender miRNAs im Plasma gemessen haben. Die Erkenntnisse aus ihrer Studie müssen unserer ursprünglichen Hypothese, dass zirkulierende miRNA-Veränderungen bei OSAS-Patienten ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko vermitteln, daher nicht unbedingt widersprechen, sondern die Ergebnisse beider Studien könnten im Gegenteil unterschiedliche Aspekte des gleichen oder ähnlicher Phänomene beleuchten. Man könnte möglicherweise argumentieren, dass nicht auszuschließen ist, dass erhöhte Konzentration zirkulierender miRNAs zum Teil mit verminderten zellulären Konzentrationen einhergehen. In dem Fall könnten erhöhte Konzentrationen zirkulierender miRNAs trotzdem mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergehen. Eine Untersuchung der genauen Zusammenhänge zwischen den zellulären und zirkulierenden miRNA-Konzentrationen und die Frage, wie diese sich zueinander verhalten und in welchen zeitlichen Zusammenhängen sie sich zueinander verändern, wäre hier essenziell und könnte einen wertvollen Informationszugewinn bedeuten.

Eine weitere Überlegung, wie sich die Ergebnisse der präsentierten Studien mit unserer Hypothese und unseren Ergebnissen in Einklang bringen ließen, beruht auf den Theorien der Arbeitsgruppe um Xin et al., die propagieren, dass miRNAs in ihrer Funktion eher eine balancierende Rolle ausüben und daher sowohl eine starke Zunahme als auch eine Abnahme dysfunktionale Wirkungen haben.<sup>80</sup> Diese Hypothese beruht auch auf den Erkenntnissen von Choi et al., die die balancierende Wirkung von miR-430 untersucht haben.<sup>81</sup> Dies hätte zur Konsequenz, dass die Richtung der miRNA-Konzentrationsveränderung nicht in jedem Fall entscheidend wäre und man allein durch die Konzentrationsveränderung bzw. die Dysregulation der miRNA-Expression ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko erklären könnte. Eine andere Möglichkeit der Erklärung der scheinbaren Widersprüchlichkeit zwischen unseren Ergebnissen und den Erkenntnissen aus einigen der präsentierten Studien wäre die Hypothese, dass morgendliche miR-145-Werte bei OSAS-Patienten erhöht sind, um mögliche stattgefundenen Schädigungen durch die rekurrenden nächtlichen Hypoxien zu vermindern. In diesem Fall könnte man die morgendliche miR-145-Erhöhung dementsprechend als physiologische, gegenregulatorische Reaktion auf die OSAS-Symptomatik interpretieren, die die kardiovaskuläre Risikoerhöhung nicht vermittelt, sondern im Gegenteil verhindert oder zumindest vermindert. Um diese These weitergehend zu prüfen und diesbezüglich adäquate Aussagen treffen zu können, wären erneut weitere Studien und genauere Erkenntnisse der exakten zeitlichen Abläufe von miRNA-Ausschüttungen und Zirkulationsdauer von Nöten.<sup>7</sup> Es wäre in diesem Kontext ebenfalls sinnvoll zu untersuchen, ob die miR-145-Konzentrationen zu einem früheren Zeitpunkt in der Nacht bzw. noch deutlich früher am Morgen möglicherweise verringert gewesen waren, was erneut Argument für die These wäre, dass die miRNA-Konzentrationserhöhungen, die wir gemessen haben, einer physiologischen Gegenregulation entsprechen könnten, die in dem Fall dann kardioprotektiv wirken könnte. In jedem Fall lässt sich festhalten, dass es verschiedene Ansätze gibt, mit denen sich argumentieren lässt, dass nächtliche miR-145-Konzentrationsveränderungen verschiedene physiologische und kardiovaskulär relevante Prozesse beeinflussen könnten und sich damit direkt oder indirekt auf das kardiovaskuläre Risiko von OSAS-Patienten auswirken könnten.

### **5.3. Möglichkeit der Nutzung von miR-145 als Biomarker**

#### **5.3.1. Allgemeine Potenzielle OSAS-Biomarker**

Die Erkenntnis einer signifikanten nächtlichen Konzentrationserhöhung von zirkulierender miR-145 bei OSAS-Patienten bietet ebenfalls Anlass für die Frage nach einer möglichen Nutzbarkeit von miRNAs als Biomarker für die Diagnostik von OSAS oder für die Risikostratifikation bezüglich kardiovaskulärer Ereignisse bei OSAS-Patienten.

Bisher wurde für die Biomarker-Diagnostik bei OSAS vor allem die Nutzung von Inflammationsmarkern wie C-reaktives Protein (CRP), TNF- $\alpha$  und IL-6 sowie IL-8 in Betracht

gezogen. Bei den einzelnen Markern konnten in der Vergangenheit jeweils Korrelationen mit OSAS festgestellt werden.<sup>48</sup> Gleichzeitig konnte in verschiedenen Studien wiederholt eine Normalisierung der entsprechenden Werte durch eine CPAP-Therapie gezeigt werden, die die Hypothese eines Kausalzusammenhanges von OSAS-Symptomen und den veränderten Inflammationsmarkern zusätzlich stützt.<sup>82</sup> Ein breiter Einsatz von Inflammationsmarkern bei der Diagnostik und Therapiekontrolle von OSAS konnte bisher aber nicht etabliert werden. Grund dafür ist vor allem der unspezifische Charakter und die große Bandbreite physiologischer oder pathologischer Veränderungen, die potenziell Ursache einer Wertveränderung darstellen können. Außerdem konnte festgestellt werden, dass auch eine Reduktion der Schlafdauer ohne pathologischen Wert bei jungen, gesunden und normalgewichtigen Männern zu einem Anstieg von TNF- $\alpha$  und IL-6 geführt hat und diese daher nicht unbedingt mit OSAS sondern lediglich mit Schlafmangel verknüpft sein könnten.<sup>83</sup> Ein weiteres Problem bei der Nutzung inflammatorischer Marker ist die Tatsache, dass Adipozyten ebenfalls verstärkt IL-6 und TNF- $\alpha$  produzieren und diese Werte daher bei Adipositas, was eine häufige Komorbidität des OSAS ist, ohnehin oft erhöht sind.<sup>84</sup> In einer Studie, bei der viele verschiedene inflammatorische Marker bei adipösen Menschen sowie adipösen Menschen mit OSAS verglichen wurden, konnte nur bei TNF- $\alpha$  ein Unterschied festgestellt werden.<sup>84</sup> Daher sind inflammatorische Marker zur alleinigen OSAS-Diagnostik eher nicht ausreichend.

### **5.3.2. Grundlagen für die Nutzung von miRNAs als Biomarker**

Extrazellulären miRNAs, die im Blutplasma zirkulieren, wird ein großes Potenzial zugeschrieben, da sie die Möglichkeit diverser diagnostischer und therapeutischer Anwendungen bergen. Sie könnten daher als eine mögliche Alternative zu den genannten klassischen Biomarkern in Betracht gezogen werden. Grundlage dafür sind zum einen die stabilen, konsistenten und reproduzierbaren miRNA-Konzentrationen im Plasma und zum anderen die angenommene Korrelation zwischen miRNA-Konzentrationen und Zustand der Zellen und Gewebe.<sup>4</sup>

Im Gegensatz zu zellulärer RNA konnte in Studien beobachtet werden, dass die zirkulierenden extrazellulären miRNAs selbst unter widrigen Umständen wie starken Temperatur- und pH-Schwankungen konstante Spiegel aufweisen.<sup>56</sup> Diese Tatsache lässt sich sowohl auf den Transport in Vesikeln als auch auf die Proteinbindung zurückführen, die die Degradierung der miRNAs durch RNasen verhindern und dadurch deren Stabilität im extrazellulären Milieu erhöhen.<sup>53</sup>

Die Korrelation der miRNA-Spiegel im Plasma mit dem realen Zustand bzw. Arbeitsmodus der Zellen konnte in verschiedenen Studien belegt werden.<sup>85</sup> Zum einen ist schon die zelluläre Expression der miRNAs unterschiedlich reguliert und von verschiedenen physiologischen Prozessen abhängig. Dies impliziert, dass bereits die Anzahl und die Art der im Cytoplasma vorkommenden miRNA-Moleküle vom Zustand und Typ der entsprechenden Zelle abhängig

sind.<sup>6</sup> Zum anderen sind die Sekretionsmechanismen der miRNAs vom Gewebe- oder Zellzustand sowie von exogenen Faktoren abhängig. Offensichtlich ist dies bei apoptotischen Körpern, die beim Zugrundegehen von Zellen entstehen und miRNAs sowie andere Zellbestandteile in den Extrazellulärraum transportieren; aber auch andere extrazelluläre Vesikel werden sowohl als Reaktion auf Stresssignale oder Reize wie Thrombin, extrazelluläres ATP oder Hypoxien als auch als Reaktion auf endotheliale Schädigung verstärkt ausgeschüttet.<sup>58,86</sup> Weiterhin ist belegt, dass es nicht nur aufgrund von Zellschädigung oder Apoptose zur miRNA-Ausschüttung kommt, sondern dass daneben auch eine regulierte Sekretion stattfindet.<sup>6</sup> Geregelt wird diese über einen Ceramid-abhängigen Mechanismus.<sup>87</sup>

### **5.3.3. miRNAs als Diagnostische Marker**

Wenn nun also davon ausgegangen werden kann, dass sich miRNA-Spiegel im Plasma prinzipiell als Biomarker zur Diagnose verschiedener Pathologien eignen, schließt sich die Frage an, ob sich miRNAs auch zur Früherkennung oder Risikostratifikation bei Schlafapnoe einsetzen lassen. Es gibt bereits einige Studien, die verschiedene miRNA-Moleküle daraufhin untersucht haben, inwieweit sich ihre Konzentrationen bei verschiedenen Pathologien verändern und die dabei eine Vielzahl von signifikanten Konzentrationsveränderungen unterschiedlicher miRNAs in unterschiedlichen Kontexten identifizieren konnten. Allerdings sind die Richtungen dieser Veränderungen zum Teil verschieden und spezifisch für bestimmte miRNAs und die Art der Pathologie. Hier steht die Frage im Vordergrund, inwieweit spezifische miRNAs frühzeitige Hinweise auf ein akutes oder chronisches pathologisches Geschehen geben können. Insgesamt hat man in diesem Kontext festgestellt, dass in den meisten Fällen nicht einzelne miRNAs ausschlaggebend sind, sondern parallele Konzentrationsveränderungen spezifischer miRNA-Kombinationen, sogenannter miRNA-Signatures.<sup>88</sup> Bisher waren die Schwerpunkte bei der Suche nach Möglichkeiten der Nutzung von miRNAs zur Biomarker-Diagnostik die Bereiche kardiovaskulärer Erkrankungen und onkologischer Erkrankungen.

Beispielsweise existieren bereits einige Studien, die potenzielle miRNA-Biomarker für einen Myokardinfarkt untersuchen. Auch hier scheint miR-145 zum Teil eine Rolle zu spielen. Li et al. konnten in ihren Analysen miR-1, miR-134, miR-186, miR-208, miR-223, miR-499 als Biomarker für einen akuten Myokardinfarkt isolieren, die im Falle eines Infarktes alle erhöht waren.<sup>89</sup> Ähnliche Resultate gab es auch bei der Arbeitsgruppe um Meder et al. Diese konnten eine miRNA-Signature bestehend aus 20 einzelnen miRNAs ausfindig machen, die bei einem Myokardinfarkt zum Teil verstärkt, z.B. miR-142-5p, und zum Teil vermindert ausgeschüttet werden, z.B. miR-492 oder miR-497. Weiterhin gibt Hinweise, dass die Höhe der miR-145 Konzentrationen bei Patienten mit Myokardinfarkt mit der Größe des Infarktes korreliert.<sup>90</sup> Im

Vergleich zum klassisch verwendeten Biomarker Troponin könnte durch die miRNA-Signature zum Teil sogar eine frühere Diagnose ermöglicht werden.<sup>90</sup>

Als Beispiel für die potenzielle Nutzbarkeit von miRNAs im onkologischen Kontext sei hier die Studie von Liu et al. genannt. Hier wurden Veränderungen zirkulierender miRNA-Konzentrationen bei Patienten mit Magen-Karzinomen untersucht. Auch hier konnte eine miRNA-Signature, bestehend aus miR-1, miR-20a, miR-27a, miR-34 und miR-423-5p, identifiziert werden, die als Biomarker zur Detektion von Magen-Karzinomen genutzt werden könnte und den Studienergebnissen zufolge ebenfalls eine größere Genauigkeit als die bisher angewandten Biomarker CEA und CA19-9 aufweisen könnte.<sup>91</sup>

Theoretisch könnten miRNA-Biomarker zukünftig aber nicht nur in kardiologischen oder onkologischen Bereichen, sondern in vielen verschiedenen klinischen Feldern potenziell erkenntnisbringend eingesetzt werden. Die Ergänzung der OSAS-Diagnostik durch miRNA-Biomarker könnte hier daher ein relevantes Beispiel sein. Die Fragestellung unserer Studie beleuchtet bisher nur die akute Reaktion auf nächtliche OSAS-Symptomatik. Daher können sich Aussagen über eine mögliche Anwendbarkeit als Biomarker nur auf eine morgendliche Messung beziehen, bei der man Patienten unmittelbar oder so früh wie möglich nach einer Nacht mit fraglicher OSAS-Symptomatik Blut abnimmt und dieses im Hinblick auf die miRNA-Konzentration untersucht. Bei einer gesteigerten Menge an miR-145 könnte dies, unseren Ergebnissen folgend, ein Hinweis auf das Bestehen einer OSAS-Symptomatik sein. Da ein Großteil der gängigen Labordiagnostik ohnehin nüchtern und am frühen Morgen erfolgen soll, könnte sich eine frühe Blutabnahme zu Zwecken der OSAS-Diagnostik relativ nahtlos in diese Praxis miteingliedern.

Ein großer Vorteil würde in dem Fall darin bestehen, eine umfassende Testung großer Bevölkerungsteile zu ermöglichen. Bei einem Testverfahren, das mit einem großen zeitlichen, personellen und finanziellen Aufwand verbunden ist, wie es bei der Polysomnographie der Fall ist, steht außer Frage, dass Diagnostik nur bei einem konkreten Verdacht und Beschwerden durchgeführt wird. Dies ist in dem Fall angemessen, hat aber zur Folge, dass das OSAS insgesamt vermutlich deutlich unterdiagnostiziert ist und entsprechend große Anteile des Patientenkollektivs dadurch unter einem unnötig erhöhten kardiovaskulären Risiko leiden.<sup>10</sup> Eine einfache morgendliche Blutabnahme könnte dagegen relativ einfach in den Katalog einer standardisierten Vorsorgediagnostik im Sinne einer Sekundärprävention aufgenommen werden. Dies könnte eine Chance sein, viele Patienten zu diagnostizieren, die entweder aus Gründen mangelnden Bewusstseins ihrer Symptomatik bisher nicht erfasst wurden oder bisher skeptisch gegenüber einer relativ zeitaufwendigen Diagnostik waren, die zum Teil einen Krankenhausaufenthalt beinhaltet, und diese daher nicht wahrgenommen haben. Ebenso könnte dies eventuell zu einem deutlichen Anstieg an Diagnosen bei weiblichen oder jüngeren Patienten führen, die generell möglicherweise nicht dem klassisch erwarteten OSAS-

Patientenkollektiv entsprechen und daher aufgrund eines gegebenenfalls vorhandenen Bias des Behandlers nicht direkt als potenzielle Patienten erkannt werden.

Problem und Chance zugleich ist in diesem Fall der akute Charakter der miRNA-Messung. Unsere Studie lässt keinerlei Rückschlüsse über die langfristige Entwicklung der betrachteten miRNA-Konzentrationen zu, sondern beruht im Gegenteil auf der Volatilität und Dynamik der kurzfristigen Veränderungen als Reaktion auf akute Zustände. Eine genaue Haltbarkeit der entsprechenden miRNA-Moleküle lässt sich bisher nur schwer voraussagen. In frühen Studien von Mitchell et al. wurde *in vitro* die Haltbarkeit von endogenen miRNAs untersucht, wobei sie festgestellt haben, dass diese über 24 h und zum Teil bis zu vier Tage relativ stabil waren, woraus sie ableiten konnten, dass die körpereigenen miRNAs durch verschiedene Mechanismen vor dem Abbau durch RNasen geschützt sein müssen.<sup>56</sup> Es ist allerdings davon auszugehen, dass *in vivo* ein größerer Umsatz vorliegt und sich die Zusammensetzung der Gesamtheit zirkulierender miRNAs zügiger verändert und anpasst. Der Schutz gegenüber körpereigenen RNasen liegt zwar auch *in vivo* vor, allerdings kommt es hier zu einer erneuten Aufnahme von miRNAs in die Zellen, wodurch Konzentrationen zusätzlich verändert werden könnten.<sup>6</sup> Die Arbeitsgruppe um Eichhorn et al. hat in ihren Untersuchungen festgestellt, dass die Ausschüttung von miR-21, miR-26 und miR-126 nach einer Apnoephase sehr schnell stark ansteigt und bereits nach 30 Minuten ihr Maximum erreicht.<sup>5</sup> Eine andere Arbeitsgruppe um Tiedt et al. hat verschiedene miRNAs auf ihre Tauglichkeit als akuten Biomarker eines akuten Apoplex untersucht und hat in diesem Rahmen für miR-143-3p einen maximalen Anstieg der Expression nach 2,3 h festgestellt. Für miR-125b-5p lag dieser bei 4,5 h und für miR-125a-5p bei 6,5 h nach Symptombeginn.<sup>92</sup> Wie sich miR-145 im zeitlichen Verlauf genau verändert, gilt es zu untersuchen, aber es ist vorstellbar, dass bei miR-145 ein ähnliches Zeitfenster darstellbar ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie suggerieren dies auf jeden Fall.

Dies macht es möglich, durch eine morgendliche Messung ein relativ exaktes Bild bezüglich der OSAS-Symptomatik in der vorangegangenen Nacht zu ermitteln, was beispielsweise auch vorteilhaft wäre, um kurzfristig Behandlungserfolge oder -strategien zu überprüfen. Die Nutzung von miRNA-Biomarkern könnte es in diesem Fall möglich machen, die Wirksamkeit von Behandlungen oder den Grad der Wirksamkeit der Behandlungen direkt quantitativ zu überprüfen, was eine deutlich schnellere und zielgerichtete Anpassung von der Behandlung und den Behandlungsstrategien ermöglichen könnte.

Auf der anderen Seite könnte dieser akute, kurzfristige Charakter der Messergebnisse natürlich auch eine erhebliche Fehlerquelle einer solchen Diagnostik darstellen, da singulär eine einzelne Nacht beleuchtet wird. Dadurch könnte sich ein bestehendes OSAS aufgrund von mangelndem Schlaf, ungewöhnlichen Schlafpositionen oder ähnlichen Einzelfaktoren in der entsprechenden Nacht möglicherweise nicht in der eigentlich zu erwartenden miRNA-Konzentrationsveränderung niederschlagen, wodurch die OSAS-Grundproblematik



übersehen werden könnte. Hier gilt es weiterhin zu untersuchen, ab welcher Schlafdauer bzw. Symptomstärke sich messbare Veränderungen darstellen, um hier genauer die Möglichkeiten und Grenzen der Diagnostik auszuleuchten.

Es lassen sich insgesamt keinerlei Schlüsse über langfristige Vorgänge ziehen, da zumindest unsere Studie aufgrund ihres Pilot-Charakters dazu keine Daten liefert. Ob es durch eine andauernde OSAS-Symptomatik auch zu einer dauerhaften Verschiebung oder Veränderung von miRNA-Signatures oder -Konzentrationen kommt, müsste in weiterführenden Studien untersucht werden. Auch diese Frage birgt großes Potenzial und könnte zu weiteren interessanten Anwendungsmöglichkeiten führen und das Verständnis der OSAS-Pathomechanismen weiter vertiefen.

#### **5.3.4. miRNAs als Prognostische Marker**

Neben der potenziellen Nutzung von miRNAs zur unmittelbaren Diagnostik von OSAS steht auch die Möglichkeit im Raum, diese eher zur Prognosebestimmung bzw. Risikostratifikation im Hinblick auf eine Erhöhung des kardiovaskulären Risikos bei OSAS-Patienten zu nutzen. Prominent und vielzitiert ist hier die HUNT-Studie der Arbeitsgruppe um Bye et al. Dort wurde die Frage untersucht, inwieweit zirkulierende miRNAs letale kardiovaskuläre Endpunkte, namentlich Myokardinfarkte vorhersagen könnten. Als Ergebnis konnte festgestellt werden, dass insbesondere die Kombination aus fünf spezifischen miRNAs, namentlich miR-106a-5p, miR-424-5p, let-7g-5p, miR-144-3p und miR-660-5p zu 77,6% eine korrekte Risikoklassifizierung der Probanden ermöglicht hat und damit für einen Zeitraum von 10 Jahren relativ zuverlässig Myokardinfarkte vorhersagen konnte.<sup>93</sup>

Vergangene Studien konnten auch speziell miR-145 bereits als signifikanten prognostischen Marker kardiovaskulärer Pathologien identifizieren. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Konzentration zirkulierender miR-145 fünf Tage nach einem akuten Myokardinfarkt ein signifikanter und unabhängiger Prädiktor der Langzeitmortalität der Patienten war.<sup>94</sup> Eine weitere Studie, die ähnliche Zusammenhänge darstellen konnte, stammt von der Arbeitsgruppe um Gao et al. Hier wurden verschiedene Patienten mit unterschiedlichen Ausmaßen koronarer Verschlüsse untersucht. Auch dort war nicht nur ein signifikanter Unterschied der miR-145-Konzentration zwischen KHK-Patienten und kardiologisch gesunden Patienten feststellbar, sondern es gab auch eine deutliche negative Assoziation zwischen Schweregrad der KHK und der miR-145-Konzentration. Auch diese Studie gab daher Anlass für die These, dass sich aus der Höhe der miR-145-Konzentration zumindest Aussagen über mögliche Entwicklungs- und Progressionstendenzen kardialer Pathologien ableiten lassen.<sup>95</sup>

Dies Beobachtungen würden insgesamt bedeuten, dass eine weitere potenzielle Anwendung der Ergebnisse unserer Studie in der Anwendung von miR-145 als prognostischer Biomarker bestehen könnte. Hier würde nicht so sehr eine Diagnostik von OSAS im Vordergrund stehen, sondern eher die Frage, in welchem Maße durch OSAS und gegebenenfalls auch durch

andere Faktoren ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko vorliegt. Hier gibt es zwar auch bereits einige Marker, aber miR-145 könnte besonders im Hinblick auf OSAS möglicherweise eine sinnvolle Ergänzung darstellen. Eventuell könnte dieser Faktor des Grades der kardiovaskulären Gefährdung dann auch viel stärker als bisher in die Entscheidung zu verschiedenen therapeutischen Optionen für OSAS mit einfließen. So könnten beispielsweise invasivere Eingriffe auch bei geringer OSAS-Symptomatik, aufgrund eines erhöhten kardiovaskulären Risikos eher gerechtfertigt werden oder andererseits könnte man wissenschaftlich begründen, weshalb ein vorsichtiges und konservatives Vorgehen zur Therapie ausreicht, zumindest solange die individuelle Symptomatik des jeweiligen Patienten dies zulässt.

#### **5.4. Möglichkeit der therapeutischen Anwendung von miR-145**

Eine weitere potenzielle zukünftige Anwendungsmöglichkeit bezieht sich auf die Aussicht einer therapeutischen Nutzbarkeit von miR-145. Hosen et al. beschäftigen sich ausführlich mit der Möglichkeit der Nutzung von miRNAs im therapeutischen Kontext von kardiovaskulären Erkrankungen und propagieren eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen, wie miRNAs hier zum Einsatz kommen könnten. Zur Inhibition bestimmter miRNAs könnten Oligonukleotide genutzt werden, entweder in Form von synthetischen Antisense-Oligonukleotiden, die als AntagomiR die jeweiligen miRNAs blockieren, oder in Form von short interfering RNAs (siRNAs), die ebenfalls eine Inhibition der miRNAs vermitteln können, indem sie RNA Duplexe bilden.<sup>96</sup> Andererseits kann natürlich eine verstärkte Expression bestimmter miRNAs therapeutisch sinnvoll sein. Auch hier kommen wiederum verschiedene Mechanismen in Betracht. Zum Beispiel existiert die Möglichkeit der Nutzung sogenannter miRNA-Mimics, die die Konzentration endogener miRNAs künstlich erhöhen. Weiterhin gibt es Ansätze der miRNA-Einschleusung über Adenoviren.<sup>96</sup>

Das große Potenzial zeigt sich in einer Studie der Arbeitsgruppe um Xu et al., die in Ratten mit Myokardinfarkt mithilfe von Lentiviren eine Überexpression von miR-145 bewirkt haben und dadurch eine verbesserte kardiale Funktion, verringertes Narbengewebe sowie eine verminderte Zahl infarktinduzierter Apoptosen bewirken konnten.<sup>97</sup> In einer sehr ähnlichen Studie wurde in einem therapeutischen Ansatz miR-145 über Adenoviren in glatte Muskelzellen atherosklerotischer oder durch Ballonkatheter verletzter Arterien integriert, wodurch neointimales Wachstum verhindert wurde und die Differenzierung der glatten vaskulären Muskelzellen gefördert wurde.<sup>98</sup> Eine therapeutische und heilungsfördernde Rolle von miR-145 in diesem Kontext wurde durch weitere Untersuchungen zusätzlich belegt, in denen man mithilfe eines miR-145-Antagomirs jeweils kurz vor und nach einem Myokardinfarkt die miR-145-Wirkung antagonisiert hat, was zu einer verstärkten Narbenbildung geführt hat.<sup>99</sup>

Viele der Studien in diesem Bereich suggerieren, dass die therapeutische Nutzung von miRNAs durch ihre Überexpression oder Inhibierung eine große Chance darstellt, nichtsdestotrotz sind in diesem Bereich noch einige Fragen ungeklärt, die in weiteren Studien weitergehend untersucht werden sollten.

### **5.5. Fehler oder Probleme der Analyse**

Die Ergebnisse unserer Studie sind zum Teil nicht ganz eindeutig und können nicht in allen Fällen als signifikant gesehen werden. Dies ist zu einem gewissen Anteil auch durch einige formale Limitierungen im Studienaufbau und grundsätzliche Schwierigkeiten in der miRNA-Analyse bedingt.

Wenn man die Limitierungen der durchgeführten Studie betrachtet, fällt natürlich zunächst die relativ geringe Fallzahl auf, die maßgeblich durch den Pilot-Charakter dieser Studie bedingt ist. Die Fallzahlen unterscheiden sich bei den einzelnen miRNAs aufgrund zum Teil fehlender Detektierbarkeit der entsprechenden miRNA-Moleküle in einzelnen Blutproben. Daher rangieren die n-Werte zwischen 4 und 17, wenngleich ursprünglich Blutproben von insgesamt 22 Patienten gesammelt und eingeschlossen wurden. Die Ergebnisse müssen daher auch vor diesem Hintergrund der geringen Fallzahl interpretiert werden. Um genauere Aussagen zu treffen, ist es nötig, die Studie fortzuführen, weiter entsprechende Daten zu sammeln und beobachtete Tendenzen damit zu bestätigen oder auch um diese endgültig zu verwerfen. Dass sich bei miR-145 bereits bei dieser relativ geringen Probandenzahl ein signifikantes Ergebnis im Prä-Post-Vergleich im Hinblick auf die Nacht gezeigt hat, lässt den Schluss zu, dass hier mit relativ großer Wahrscheinlichkeit eine Korrelation vorliegt. Die anderen miRNAs sollten als potenzielle Biomarker oder Vermittler allerdings auch in zukünftigen Studien möglichst erneut eingeschlossen werden, um eine gegebenenfalls doch vorhandene Korrelation mit größeren Fallzahlen erneut zu prüfen.<sup>7</sup>

Eine weitere Limitierung dieser Studie liegt im fehlenden Vergleich zur gesunden Gesamtbevölkerung begründet. Auch dies konnte aufgrund des Pilot-Charakters der Studie in diesem Rahmen noch nicht umgesetzt werden, sollte aber in zukünftigen Studien ebenfalls weitergehend geprüft werden. Hier gilt es auszuschließen, dass die beobachteten Effekte möglicherweise auf allgemeinen physiologischen oder aber anderen unbekanntem pathologischen Prozessen in der Nacht beruhen, die auch bei gesunden Probanden mit unauffälligen AHI-Werten messbar sind.

Diese Studie ließe sich gegebenenfalls außerdem optimieren, indem man eine einheitlichere Studienkohorte gewählt hätte. In diesem Fall lagen die AHI-Werte der einzelnen Probanden sehr weit auseinander, was einer Interpretation der Ergebnisse etwas schwieriger macht. Eine weitergehende Differenzierung der Patienten im Hinblick auf den Schweregrad ihres OSAS könnte hier Abhilfe schaffen. Zum Teil weisen die Patienten ebenfalls nur sehr geringe AHI-Werte auf, was die Ergebnisse möglicherweise leicht verfremden könnte.

Weiterhin problematisch und in zukünftigen Studien zu optimieren, wäre die zeitliche Konsistenz der zweiten Blutabnahme, die morgens durchgeführt wurde. Durch die praktischen Bedingungen im Klinikalltag war es hier nicht möglich, die Zeitabstände zwischen dem Aufwachen des Patienten und der Blutabnahme komplett gleich zu gestalten. Um eine noch bessere Vergleichbarkeit zu schaffen, läge hier daher möglicherweise ein Ansatzpunkt für eine Optimierung in den weiterführenden Untersuchungen.

Weitere mögliche Probleme bzw. Limitierungen der Studie liegen im Bereich der Probenverarbeitung und miRNA-Analyse per Microarray und qPCR, die in diesem Rahmen einige typische Probleme mit sich bringen. Problematisch am Aspekt der Probenverarbeitung ist vor allem die Gefahr der zellulären Kontamination durch unvollständige Phasentrennung oder eine Verunreinigung der Probe durch zelluläre miRNAs aus hämolysierten Erythrozyten oder aus zerstörten Thrombozyten.<sup>4</sup> Die von uns angewendete dreifache Zentrifugation dient der Vermeidung einer solchen Kontamination.

Bei unserer Analyse hat sich als wiederholt problematisch vor allem eine mangelhafte Detektierbarkeit verschiedener miRNAs gezeigt. Dies war besonders bei miR-505 und miR-133a der Fall, was bei diesen miRNAs zu sehr niedrigen Fallzahlen und einer dadurch erheblich eingeschränkten Aussagefähigkeit unserer Ergebnisse geführt hat. Das zugrunde liegende Problem konnte hier nicht eindeutig identifiziert werden, hängt aber möglicherweise vor allem mit dem Prozess der RNA-Isolation bzw. bereits der Probenaufarbeitung zusammen. Des Weiteren ist die Vergleichbarkeit bei miRNA-Analysen im Allgemeinen dadurch erschwert, dass es keine universalen, standardisierte RNA zur Normalisierung gibt.<sup>57</sup> In diesem Fall haben wir Cel-miR-39 verwendet, die im menschlichen Organismus physiologisch nicht vorkommt.<sup>56</sup> Cel-Mir-39 wurde im Vorfeld der RNA-Isolation vor der qPCR dem Reaktionsgemisch in bekannter Menge hinzugefügt. Dies hat es uns bei der Quantifizierung der miRNAs ermöglicht, Variabilität und Schwankungen der Isolations- und Analysetechniken zu einem gewissen Maße herauszurechnen und auszugleichen. Unterschiede in der Qualität bzw. Effizienz der miRNA-Extraktion lassen sich mit dieser Methode allerdings nicht aufdecken.<sup>57</sup> Um eine bessere Vergleichbarkeit auf allen Ebenen zu erreichen, fehlen allgemein akzeptierte Methoden und Standards bezüglich der Normalisierung, die eine bessere Belastbarkeit der Ergebnisse schaffen könnten.

Trotz dieser Probleme geben die signifikanten Ergebnisse dieser Studie insgesamt Anlass dazu, weitere Studien zu den Zusammenhängen von verschiedenen miRNAs und OSAS durchzuführen. Potenziell bietet dieses Forschungsgebiet eine Vielzahl an vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten und könnte in Zukunft sowohl in der Kardiologie als auch in der Schlafmedizin eine große Rolle spielen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Franklin KA, Lindberg E. Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population—a review on the epidemiology of sleep apnea. *J Thorac Dis* 2015; **7**: 1311–22.
- 2 Monahan K, Redline S. Role of obstructive sleep apnea in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 2011; **26**: 541–7.
- 3 Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 2000; **342**: 1378–84.
- 4 Iftikhar H, Carney GE. Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing. *BioEssays* 2016; **38**: 367–78.
- 5 Eichhorn L, Dolscheid-Pommerich R, Erdfelder F, *et al.* Sustained apnea induces endothelial activation. *Clin Cardiol* 2017; **40**: 704–9.
- 6 O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol* 2018; **9**: 402.
- 7 Goody PR, Nachtsheim L, Hosen MR, *et al.* Analysis of nocturnal, hypoxia-induced miRNAs in sleep apnea patients. *PLOS ONE* 2022; **17**: e0263747. DOI:10.1371/journal.pone.0263747
- 8 Wang W, Chen L, Shang C, *et al.* miR-145 inhibits the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells by regulating autophagy. *J Cell Mol Med* 2020; **24**: 6658–69.
- 9 Caruso P, Dempsey Y, Stevens HC, *et al.* A Role for miR-145 in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res* 2012; **111**: 290–300.
- 10 Ho ML, Brass SD. Obstructive sleep apnea. *Neurol Int* 2011; **3**: e15. DOI:10.4081/ni.2011.e15
- 11 Khurana S, Sharda S, Saha B, Kumar S, Guleria R, Bose S. Canvassing the aetiology, prognosis and molecular signatures of obstructive sleep apnoea. *Biomarkers* 2019; **24**: 1–16.
- 12 Sharma H, Sharma SK. Overview and implications of obstructive sleep apnoea. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2008; **50**: 137–50.
- 13 Johns MW. A New Method for Measuring Daytime Sleepiness: The Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 1991; **14**: 540–5.
- 14 Gottlieb DJ, Whitney CW, Bonekat WH, *et al.* Relation of Sleepiness to Respiratory Disturbance Index: The Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **159**: 502–7.
- 15 Nakayama-Ashida Y, Takegami M, Chin K, *et al.* Sleep-Disordered Breathing in the Usual Lifestyle Setting as Detected with Home Monitoring in a Population of Working Men in Japan. *Sleep* 2008; **31**: 419–25.
- 16 Franklin KA, Sahlin C, Stenlund H, Lindberg E. Sleep apnoea is a common occurrence in females. *Eur Respir J* 2013; **41**: 610–5.
- 17 Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, *et al.* The global obesity pandemic: shaped by global

drivers and local environments. *The Lancet* 2011; **378**: 804–14.

18 Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **165**: 1217–39.

19 Drager LF, Bortolotto LA, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Effects of Continuous Positive Airway Pressure on Early Signs of Atherosclerosis in Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **176**: 706–12.

20 Catcheside PG. Predictors of continuous positive airway pressure adherence. *F1000 Med Rep* 2010; **2**: 70.

21 Machado MAC, Juliano L, Taga M, de Carvalho LBC, do Prado LBF, do Prado GF. Titratable mandibular repositioner appliances for obstructive sleep apnea syndrome: are they an option? *Sleep Breath* 2007; **11**: 225–31.

22 Anand VK, Ferguson PW, Schoen LS. Obstructive Sleep Apnea: A Comparison of Continuous Positive Airway Pressure and Surgical Treatment. *Otolaryngol Neck Surg* 1991; **105**: 382–90.

23 Lye KW, Waite PD, Meara D, Wang D. Quality of Life Evaluation of Maxillomandibular Advancement Surgery for Treatment of Obstructive Sleep Apnea. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; **66**: 968–72.

24 Woodson BT, Soose RJ, Gillespie MB, *et al.* Three-Year Outcomes of Cranial Nerve Stimulation for Obstructive Sleep Apnea: The STAR Trial. *Otolaryngol Neck Surg* 2016; **154**: 181–8.

25 Young T, Peppard PE, Taheri S. Excess weight and sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol* 2005; **99**: 1592–9.

26 Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J. Longitudinal Study of Moderate Weight Change and Sleep-Disordered Breathing. *JAMA* 2000; **284**: 3015–21.

27 Shelton KE, Woodson H, Gay S, Suratt PM. Pharyngeal Fat in Obstructive Sleep Apnea. *Am Rev Respir Dis* 1993; **148**: 462–6.

28 Surani SR. Diabetes, sleep apnea, obesity and cardiovascular disease: Why not address them together? *World J Diabetes* 2014; **5**: 381–4.

29 Bixler EO, Vgontzas AN, Lin H-M, *et al.* Prevalence of Sleep-disordered Breathing in Women. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **163**: 608–13.

30 Quintana-Gallego E, Carmona-Bernal C, Capote F, *et al.* Gender differences in obstructive sleep apnea syndrome: a clinical study of 1166 patients. *Respir Med* 2004; **98**: 984–9.

31 Bixler EO, Vgontzas AN, Ten Have T, Tyson K, Kales A. Effects of Age on Sleep Apnea in Men. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157**: 144–8.

32 Lam JCM, Sharma SK, Lam B. Obstructive sleep apnoea: definitions, epidemiology & natural history. *Indian J Med Res* 2010; **131**: 165–70.

- 33 Bixler EO, Vgontzas AN, Lin H-M, *et al.* Blood Pressure Associated With Sleep-Disordered Breathing in a Population Sample of Children. *Hypertension* 2008; **52**: 841–6.
- 34 Krol RC, Knuth SL, Bartlett D. Selective reduction of genioglossal muscle activity by alcohol in normal human subjects. *Am Rev Respir Dis* 1984; **129**: 247–50.
- 35 Issa FG, Sullivan CE. Alcohol, snoring and sleep apnea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1982; **45**: 353–9.
- 36 Wetter DW, Young TB, Bidwell TR, Badr MS, Palta M. Smoking as a Risk Factor for Sleep-Disordered Breathing. *Arch Intern Med* 1994; **154**: 2219–24.
- 37 Trenchea M, Deleanu O, Suța M, Arghir OC. Smoking, snoring and obstructive sleep apnea. *Pneumol Buchar Rom* 2013; **62**: 52–5.
- 38 Krishnan V, Dixon-Williams S, Thornton JD. Where there is smoke...there is sleep apnea: exploring the relationship between smoking and sleep apnea. *Chest* 2014; **146**: 1673–80.
- 39 Yosunkaya S, Kutlu R, Vatansev H. Effects of smoking on patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Clin Respir J*; **15**: 147–53.
- 40 Kim KS, Kim JH, Park SY, *et al.* Smoking Induces Oropharyngeal Narrowing and Increases the Severity of Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med* 2012; **8**: 367–74.
- 41 Nuckton TJ, Glidden DV, Browner WS, Claman DM. Physical examination: Mallampati score as an independent predictor of obstructive sleep apnea. *Sleep* 2006; **29**: 903–8.
- 42 De Luca Canto G, Pachêco-Pereira C, Aydinov S, Major PW, Flores-Mir C, Gozal D. Biomarkers associated with obstructive sleep apnea: A scoping review. *Sleep Med Rev* 2015; **23**: 28–45.
- 43 Weiss JW, Liu MDY, Huang J. Physiological basis for a causal relationship of obstructive sleep apnoea to hypertension. *Exp Physiol* 2007; **92**: 21–6.
- 44 Haentjens P. The Impact of Continuous Positive Airway Pressure on Blood Pressure in Patients With Obstructive Sleep Apnea Syndrome: Evidence From a Meta-analysis of Placebo-Controlled Randomized Trials. *Arch Intern Med* 2007; **167**: 757–64.
- 45 Drager LF, Jun J, Polotsky VY. Obstructive Sleep Apnea and Dyslipidemia: Implications for Atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; **17**: 161–5.
- 46 Toraldo DM, Passali D, Sanna A, De Nuccio F, Conte L, De Benedetto M. Cost-effectiveness strategies in OSAS management: a short review. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2017; **37**: 447–53.
- 47 Ghegan MD, Angelos PC, Stonebraker AC, Gillespie MB. Laboratory versus Portable Sleep Studies: A Meta-Analysis. *The Laryngoscope* 2006; **116**: 859–64.
- 48 Nadeem R, Molnar J, Madbouly EM, *et al.* Serum Inflammatory Markers in Obstructive Sleep Apnea: A Meta-Analysis. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med* 2013;

9: 1003–12.

49 Li M, Marin-Muller C, Bharadwaj U, Chow K-H, Yao Q, Chen C. MicroRNAs: Control and Loss of Control in Human Physiology and Disease. *World J Surg* 2009; **33**: 667–84.

50 Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004; **116**: 281–97.

51 Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol* 2018; **141**: 1202–7.

52 Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 654–9.

53 Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 5003–8.

54 Katakowski M, Buller B, Wang X, Rogers T, Chopp M. Functional microRNA is transferred between glioma cells. *Cancer Res* 2010; **70**: 8259–63.

55 Jansen F, Nickenig G, Werner N. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Disease: Potential Applications in Diagnosis, Prognosis, and Epidemiology. *Circ Res* 2017; **120**: 1649–57.

56 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 10513–8.

57 Zampetaki A, Willeit P, Drozdov I, Kiechl S, Mayr M. Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovasc Res* 2012; **93**: 555–62.

58 Sluijter JPG, Verhage V, Deddens JC, van den Akker F, Doevendans PA. Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovasc Res* 2014; **102**: 302–11.

59 Huangfu F-T, Tang L-Q, Wang H-Q, Zhao X, Yang M. MiR-145-5p promotes myocardial cell apoptosis in rats with myocardial infarction through PI3K/Akt signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; **24**: 12904–11.

60 Santamaria-Martos F, Benítez I, Zapater A, *et al.* Identification and validation of circulating miRNAs as endogenous controls in obstructive sleep apnea. *PLoS ONE* 2019; **14**: e0213622. DOI:10.1371/journal.pone.0213622

61 Kochan-Jamrozy K, Króliczewski J, Moszyńska A, Collawn JF, Bartoszewski R. miRNA networks modulate human endothelial cell adaptation to cyclic hypoxia. *Cell Signal* 2019; **54**: 150–60.

62 Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, Mohsenin V. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med* 2005; **353**: 2034–41.

63 Turmel J, Sériès F, Boulet L-P, *et al.* Relationship between atherosclerosis and the sleep apnea syndrome: An intravascular ultrasound study. *Int J Cardiol* 2009; **132**: 203–9.

64 Mehra R, Benjamin EJ, Shahar E, *et al.* Association of Nocturnal Arrhythmias with



- Sleep-disordered Breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; **173**: 910–6.
- 65 Monahan K, Storfer-Isser A, Mehra R, *et al.* Triggering of nocturnal arrhythmias by sleep-disordered breathing events. *J Am Coll Cardiol* 2009; **54**: 1797–804.
- 66 Ng CY, Liu T, Shehata M, Stevens S, Chugh SS, Wang X. Meta-Analysis of Obstructive Sleep Apnea as Predictor of Atrial Fibrillation Recurrence After Catheter Ablation. *Am J Cardiol* 2011; **108**: 47–51.
- 67 Nerbass FB, Pedrosa RP, Danzi-Soares NJ, Drager LF, Arteaga-Fernández E, Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea and hypertrophic cardiomyopathy: A common and potential harmful combination. *Sleep Med Rev* 2013; **17**: 201–6.
- 68 Ip MSM, Lam B, Chan L-Y, *et al.* Circulating Nitric Oxide Is Suppressed in Obstructive Sleep Apnea and Is Reversed by Nasal Continuous Positive Airway Pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **162**: 2166–71.
- 69 Mansukhani MP, Kara T, Caples S, Somers VK. Chemoreflexes, Sleep Apnea, and Sympathetic Dysregulation. *Curr Hypertens Rep* 2014; **16**: 476.
- 70 Zamarrón C, Valdés Cuadrado L, Álvarez-Sala R. Pathophysiologic Mechanisms of Cardiovascular Disease in Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Pulm Med* 2013; **2013**: 521087.
- 71 Park C-K, Xu Z-Z, Berta T, *et al.* Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1. *Neuron* 2014; **82**: 47–54.
- 72 Fabbri M, Paone A, Calore F, *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: E2110-2116. DOI:10.1073/pnas.1209414109
- 73 Cheng Y, Liu X, Yang J, *et al.* MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* 2009; **105**: 158–66.
- 74 Boettger T, Beetz N, Kostin S, *et al.* Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J Clin Invest* 2009; **119**: 2634–47.
- 75 Elia L, Quintavalle M, Zhang J, *et al.* The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 1590–8.
- 76 Li R, Shen Q, Wu N, *et al.* MiR-145 improves macrophage-mediated inflammation through targeting Arf6. *Endocrine* 2018; **60**: 73–82.
- 77 Yuan M, Zhang L, You F, *et al.* MiR-145-5p regulates hypoxia-induced inflammatory response and apoptosis in cardiomyocytes by targeting CD40. *Mol Cell Biochem* 2017; **431**: 123–31.
- 78 Nemezc M, Alexandru N, Tanko G, Georgescu A. Role of MicroRNA in Endothelial

Dysfunction and Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2016; **18**: 87.

79 Kohlstedt K, Trouvain C, Boettger T, Shi L, Fisslthaler B, Fleming I. AMP-Activated Protein Kinase Regulates Endothelial Cell Angiotensin-Converting Enzyme Expression via p53 and the Post-Transcriptional Regulation of microRNA-143/145. *Circ Res* 2013; **112**: 1150–8.

80 Xin M, Small EM, Sutherland LB, *et al.* MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev* 2009; **23**: 2166–78.

81 Choi W-Y, Giraldez AJ, Schier AF. Target Protectors Reveal Dampening and Balancing of Nodal Agonist and Antagonist by miR-430. *Science* 2007; **318**: 271–4.

82 Montesi SB, Bajwa EK, Malhotra A. Biomarkers of Sleep Apnea. *Chest* 2012; **142**: 239–45.

83 Vgontzas AN, Zoumakis E, Bixler EO, *et al.* Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 2119–26.

84 Steiropoulos P, Papanas N, Nena E, *et al.* Inflammatory markers in middle-aged obese subjects: does obstructive sleep apnea syndrome play a role? *Mediators Inflamm* 2010; **2010**: 675320.

85 Jansen F, Nickenig G, Werner N. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2017; **120**: 1649–57.

86 Dignat-George F, Boulanger CM. The Many Faces of Endothelial Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; **31**: 27–33.

87 Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. *J Biol Chem* 2010; **285**: 17442–52.

88 Schulte C, Karakas M, Zeller T. microRNAs in cardiovascular disease – clinical application. *Clin Chem Lab Med CCLM* 2017; **55**: 687–704.

89 Li C, Fang Z, Jiang T, *et al.* Serum microRNAs profile from genome-wide serves as a fingerprint for diagnosis of acute myocardial infarction and angina pectoris. *BMC Med Genomics* 2013; **6**: 16.

90 Meder B, Keller A, Vogel B, *et al.* MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2011; **106**: 13–23.

91 Liu R, Zhang C, Hu Z, *et al.* A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *Eur J Cancer* 2011; **47**: 784–91.

92 Tiedt S, Prestel M, Rainer M, *et al.* RNA-Seq Identifies Circulating miR-125a-5p, miR-125b-5p, and miR-143-3p as Potential Biomarkers for Acute Ischemic Stroke. *Circ Res* 2017; **121**: 970–80.

- 93 Bye A, Røsjø H, Nauman J, *et al.* Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals – The HUNT study. *J Mol Cell Cardiol* 2016; **97**: 162–8.
- 94 Dong Y-M, Liu X-X, Wei G-Q, Da Y-N, Cha L, Ma C-S. Prediction of long-term outcome after acute myocardial infarction using circulating miR-145. *Scand J Clin Lab Invest* 2015; **75**: 85–91.
- 95 Gao H, Gudetti R, Matsuzawa Y, *et al.* Plasma Levels of microRNA-145 Are Associated with Severity of Coronary Artery Disease. *Plos One* 2015; **10**: e0123477. DOI:10.1371/journal.pone.0123477
- 96 Hosen MR, Goody PR, Zietzer A, Nickenig G, Jansen F. MicroRNAs As Master Regulators of Atherosclerosis: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Options. *Antioxid Redox Signal* 2020; **33**: 621–44.
- 97 Xu H, Cao H, Zhu G, Liu S, Li H. Overexpression of microRNA-145 protects against rat myocardial infarction through targeting PDCD4. *Am J Transl Res* 2017; **9**: 5003–11.
- 98 Navickas R, Gal D, Laucevičius A, Taparauskaitė A, Zdanytė M, Holvoet P. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. *Cardiovasc Res* 2016; **111**: 322–37.
- 99 Wang Y-S, Li S-H, Guo J, *et al.* Role of miR-145 in cardiac myofibroblast differentiation. *J Mol Cell Cardiol* 2014; **66**: 94–105.

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** - Relative miRNA-Quantifizierung, Microarray der Patientenproben 4)-8). (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup> **30**
- Abbildung 2** - qPCR-Ergebnisse von miR-127. A: Individuelle nächtliche Veränderungen der Ct-Werte. B: Relative miRNA-Expression  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup> **31**
- Abbildung 3** - qPCR-Ergebnisse von miR-133a. A: Individuelle nächtliche Veränderungen der Ct-Werte. B: Relative miRNA-Expression  $\pm$  SEM. (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup> **32**
- Abbildung 4** - qPCR-Ergebnisse von miR-145. A: Individuelle nächtliche Veränderungen der Ct-Werte. B: Relative miRNA-Expression  $\pm$  SEM. (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup> **33**
- Abbildung 5** - qPCR-Ergebnisse von miR-181a. A: Individuelle nächtliche Veränderungen der Ct-Werte. B: Relative miRNA-Expression  $\pm$  SEM. (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup> **34**
- Abbildung 6** - qPCR-Ergebnisse von miR-505. A: Individuelle nächtliche Veränderungen der Ct-Werte. B: Relative miRNA-Expression  $\pm$  SEM. (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup> **35**

### 7.2. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1** - Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkription, Microarray-Analyse. **23**
- Tabelle 2** - Zusammensetzung des Mastermix für die Präamplifikation, Microarray-Analyse. **24**
- Tabelle 3** - Zusammensetzung des Mastermix für die Micro Fluidic Cards Analyse. **24**
- Tabelle 4** - Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkription, qPCR. **26**
- Tabelle 5** - Zusammensetzung des Mastermix für die qPCR. **27**
- Tabelle 6** - OSAS-Schweregradeinteilung des Patientenkollektiv. (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup> **28**
- Tabelle 7** - Übersicht klinische Daten des Patientenkollektiv. (in Anlehnung an Goody et al. 2022)<sup>7</sup> **28**

## 8. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Die Ergebnisse der Dissertation wurden vorab, in Absprache mit der Betreuerin, als Artikel in der wissenschaftlichen Zeitschrift PLOS ONE veröffentlicht:

Goody PR, Nachtsheim L, Hosen MR, *et al.* Analysis of nocturnal, hypoxia-induced miRNAs in sleep apnea patients. *PLOS ONE* 2022; **17**: e0263747.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263747>