

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

Einfluss obstruktiver Schlafapnoe auf die Freisetzung von *long non-coding RNA*

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

vorgelegt von
Sabrina Böhle
aus Köln

promoviert am 01. Dezember 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. S. E. T. Jansen
2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. Dr. rer. nat. M. R. Schweiger

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Proben wurden von Frau Miriam von Krosigk und von mir selbst im Rahmen einer morgendlichen und abendlichen venösen Blutabnahme gesammelt.

Die erste Probenverarbeitung und der anschließende Transport gesammelter Proben wurden von Frau Miriam von Krosigk und von mir selbst nach entsprechender Anleitung durch Miriam von Krosigk durchgeführt.

Die weiterführende Probenverarbeitung wurde ohne meine Hilfe im Labor der kardiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Bonn durch Paula Levermann, Anna Flender und Sarah Arahouan unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Felix Jansen durchgeführt.

Die Analyse der Patientendaten erfolgte durch Dr. med. Philip Goody. Die Datensätze wurden von Dr. med. Andreas Zietzer erhoben und analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte durch Farhad Shakeri.

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 06.07.2023

Unterschrift:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bohn', is written over a horizontal line.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen meinen besonderen Dank aussprechen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Frau Priv.-Doz. Dr. med. Stefanie Jansen für die Betreuung dieser Arbeit, die freundliche Hilfe und die Anregungen, die mir einen Zugang zu dieser Thematik eröffnet haben.

Des Weiteren danke ich dem ärztlichen und pflegerischen Team der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität zu Köln, welches mich bei der Probenkollektion und Probandenrekrutierung unterstützt hat. Ebenso bedanke ich mich bei Miriam von Krosigk für die geduldige Einarbeitung in die Methoden der Probenverarbeitung.

Mein besonderer Dank gilt Philipp Seitz. Die mehrfache Durchsicht dieser Abhandlung, die kritischen Betrachtungen sowie die differenzierten Anmerkungen haben mir die Vollendung dieser Arbeit erst ermöglicht. Ferner danke ich meinen Freunden für die Unterstützung und Ermutigung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und denen ich diese Arbeit widme.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Zusammenfassung	9
2	Einleitung	10
2.1	Zielsetzung der Studie	10
2.2	Obstruktives Schlafapnoesyndrom	10
2.2.1	Definition und Klassifikation	10
2.2.2	Epidemiologie	11
2.2.3	Ursachen und Risikofaktoren	12
2.2.4	Therapie	13
2.2.5	Kardiovaskuläres Risiko von OSAS-Patienten	14
2.3	Long non-coding RNA	15
2.3.1	lncRNA im Zusammenhang mit kardiovaskulären Krankheiten	16
2.3.2	lncRNA als Biomarker	19
2.3.3	lncRNA in der Therapie	20
2.4	Einfluss des OSAS auf das lncRNA-Profil	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Material	22
3.1.1	Zellkultivierung	22
3.1.2	RNA-Isolation	22
3.1.3	RNA-Sequenzierung	22
3.1.4	qPCR	22
3.2	Methoden	22
3.2.1	Zellkultivierung	22
3.2.2	Rekrutierung und Probengewinnung	23
3.2.3	Probenverarbeitung	23
3.2.4	RNA-Isolation	24
3.2.5	RNA-Sequenzierung	24
3.2.6	qPCR-Analyse	24
3.2.7	Auswertung	25

4	Ergebnisse	26
4.1	Klinische Patientencharakteristik	26
4.2	<i>MRPL20-ASI</i> -Konzentrationsunterschiede	26
5	Diskussion	29
5.1	Interpretation von lncRNA-Konzentrationsunterschieden in der vorliegenden Studie	29
5.2	Einfluss von <i>MRPL20-ASI</i> auf das kardiovaskuläre Risiko	30
5.2.1	Kardiovaskuläres Risiko von OSAS-Patienten	30
5.2.2	Signalübertragungsweg von lncRNAs	32
5.3	<i>MRPL20-ASI</i> im Zellmodell	36
5.4	<i>MRPL20-ASI</i> als Biomarker	37
6	Literaturverzeichnis	39
7	Anhang	46
7.1	Abbildungsverzeichnis	46
7.2	Tabellenverzeichnis	46
8	Vorabveröffentlichung von Ergebnissen	47

Abkürzungsverzeichnis

AHI	Apnoe-Hypopnoe-Index
ASO	Antisense-Oligonukleotid
CIH	Chronische intermittierende Hypoxie
ESS	Epworth Sleepiness Scale
HCAEC	Human coronary artery endothelial cell, menschliche Koronararterienzelle
ICSD	International Classification of Sleep Disorders
LncRNA	long non-coding Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
ODI	Oxygen-Desaturation-Index
OSA	Obstruktive Schlafapnoe
OSAS	Obstruktives Schlafapnoesyndrom
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenzmethode
siRNA	small interfering Ribonucleic acid
TAC	Transverse Aortic Constriction
UPPP	Uvulopalatopharyngoplastik
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss der OSA auf das Expressionsprofil von lncRNAs und die daraus folgende Bedeutung für das kardiovaskuläre Risiko aufzudecken. Hierfür wurde die am stärksten regulierte lncRNA untersucht. Die Ergebnisse umfassen 22 Proben von OSA-Patienten. Das Studiendesign sah eine Blutabnahme am Abend und am darauffolgenden Morgen bei diesen Patienten vor. Diese Nacht wurde polysomnografisch überwacht, um den AHI zu ermitteln und den Schweregrad der OSA zu bestimmen. Das Plasma von vier Proben wurde einer Transkriptomanalyse mittels *paired-end RNA sequencing* unterzogen, um die am stärksten regulierte lncRNA zu ermitteln. Diese wurde für die weitere Analyse ausgewählt. Im Anschluss erfolgte eine quantitative lncRNA-Konzentrationsbestimmung aller Proben über eine Messung mit Hilfe einer qPCR-Analyse. Zusätzlich wurde die ausgewählte lncRNA MRPL20-AS1 in einem Zellmodell untersucht, um die Ergebnisse *in vitro* zu verifizieren. Dabei wurden HCAECs Hypoxie ausgesetzt und die Expression von MRPL20-AS1 gemessen.

Es konnte festgestellt werden, dass sich die Expression von MRPL20-AS1 bei Schlafapnoe-Patienten über Nacht verringerte. Die Abnahme der Expression korrelierte mit dem Schweregrad der obstruktiven Schlafapnoe, beurteilt anhand des über Nacht gemessenen AHI. Auch im Zellversuch konnte eine verringerte Expression unter Hypoxie gemessen werden.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass die OSA das Expressionsprofil von lncRNAs beeinflusst. Daraus ergibt sich möglicherweise ein erklärender Ansatz für das erhöhte kardiovaskuläre Risiko von OSA-Patienten. Ein Vergleich mit einer gesunden Gesamtbevölkerung ist dafür noch ausstehend, der in der vorliegenden Studie aufgrund ihres Pilot-Charakters nicht erfolgen konnte. Die Ergebnisse können aber als Hinweis auf ein diagnostisches und therapeutisches Potential der lncRNAs bei OSA-Patienten dienen.

2 Einleitung

2.1 Zielsetzung der Studie

In der Leitlinie zu schlafbezogenen Atemwegsstörungen wird von einem erhöhten kardiovaskulären Risiko durch Assoziationen der obstruktiven Schlafapnoe (OSA) mit der koronaren Herzkrankheit, arterieller Hypertonie und dem Vorhofflimmern berichtet. Ein Zusammenhang mit weiteren Erkrankungen, wie z. B. der Atherosklerose gilt als wahrscheinlich.¹

Endothelzellen sind das Bindeglied zwischen OSAS und der Entwicklung kardiovaskulärer Krankheiten, da ihre Funktion stark durch das OSAS beeinflusst wird und sie eine Schlüsselrolle bei der atherosklerotischen Plaqueentwicklung spielen.²

Long non-coding RNAs (lncRNAs) werden in diesem Zusammenhang erst seit kurzem erforscht.³ Deshalb war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss des OSAS auf die Freisetzung der lncRNAs und der folgenden Schädigung der Endothelzellen aufzudecken. Die Hypothese lautet, dass sich das Expressionsmuster von lncRNAs bei OSA-Patienten über Nacht verändert und dies Einfluss auf die Funktion der Gefäßendothelzellen hat.

2.2 Obstruktives Schlafapnoesyndrom

2.2.1 Definition und Klassifikation

Das obstruktive Schlafapnoesyndrom ist eine weit verbreitete Erkrankung, die durch wiederholte Atmungsstörungen während des Schlafes gekennzeichnet ist. Dabei lässt sich aufgrund eines Kollapses der oberen Atemwege ein reduzierter (Hypopnoe) oder vollständig (Apnoe) verminderter Atemwegsfluss feststellen. Bei einer Apnoephase ist der Atemfluss für mindestens 10 Sekunden um $\geq 90\%$ gegenüber dem Ausgangswert reduziert. Eine Hypopnoephase liegt definitionsgemäß vor, wenn der Atemfluss für mindestens 10 Sekunden um $\geq 30\%$ reduziert ist in Kombination mit einer Weckreaktion (Arousal) oder einem Abfall der arteriellen Sauerstoffsättigung um mindestens 4%.⁴

Der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) misst die Anzahl der Apnoe- oder Hypopnoephasen pro Stunde Schlaf und dient zur Einteilung des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms (OSAS) in drei Schweregrade (Tabelle 1). Definitionsgemäß liegt ein obstruktives Schlafapnoesyndrom

(OSAS) vor, wenn der AHI ≥ 5 ist und tagsüber Symptome bestehen oder wenn der AHI ≥ 15 ist, unabhängig von Symptomen.⁵

Tabelle 1: Schweregradeinteilung des OSAS gemäß der ICSD-3⁵

AHI	Schweregrad des OSAS
<5/h	normal
5-15/h	leicht
15-30/h	mittelschwer
>30/h	schwer

Das OSAS führt zu typischen Symptomen wie Tagesmüdigkeit, Konzentrationsschwäche und nicht erholsamem Schlaf. Darüber hinaus ist das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei Patienten, die an einem OSAS leiden, deutlich erhöht.²

2.2.2 Epidemiologie

Das obstruktive Schlafapnoesyndrom ist mit über 85% die häufigste atemabhängige Schlafstörung.⁶ Weltweit wird die Inzidenz mit 3-7% bei erwachsenen Männern und 2-5% bei erwachsenen Frauen angegeben.⁷ In der *Wisconsin Sleep Cohort Study* aus dem Jahr 1993 wurde eine Prävalenz von 24% bei Männern und 9% bei Frauen in der Altersgruppe von 30 bis 60 Jahren festgestellt. Ein mittelschweres und schweres OSAS wurde bei 9% der Männern und 4% der Frauen gefunden.⁸ In den folgenden 18 Jahren konnte die Studie eine Zunahme des OSAS registrieren (Tabelle 2). Dies wird u.a. mit der Zunahme der Adipositas, einem wichtigen Risikofaktor, in Zusammenhang gebracht. Bei den 30- bis 70-Jährigen wiesen 34% der Männer und 17% der Frauen ein leichtes OSAS auf. Ein mittelschweres oder schweres OSAS wurde bei 13% der Männer und 6% der Frauen festgestellt. Vergleicht man diese Daten, so ergibt sich eine Geschlechts- und Altersabhängigkeit der Prävalenz und eine Zunahme von 14 – 55%.⁹ Es ist zu beobachten, dass Männer mittleren bis höheren Alters 2- bis 3-mal häufiger betroffen sind als Frauen. Bei Männern im Alter von 30 bis 49 Jahren liegt die Prävalenz eines mindestens mittelschweren OSAS bei 10%, bei Frauen der gleichen Altersgruppe bei 3%. Männer zwischen 50 und 70 Jahren haben eine Prävalenz von 17%, Frauen von 9%.

Tabelle 2: Entwicklung der geschlechterspezifischen Prävalenz der OSA

Jahr	Männer	Frauen
1993	24%	9%
2011	34%	17%

2.2.3 Ursachen und Risikofaktoren

Beim OSAS handelt es sich um eine Störung der Atemregulation, bei der eine anatomische Verengung oder ein Kollaps der oberen Atemwege eine zentrale Rolle spielt.¹⁰ Vergrößerungen der Zunge oder der Tonsillen sowie verengte Nasenwege verringern den anatomischen Querschnitt, Flüssigkeits- und Fetteinlagerungen im Halsbereich erhöhen den Gewebedruck. Die Folge ist ein erhöhter transmuraler Druck, der beim Einatmen zum Kollaps der oberen Atemwege führt.

Im Wachzustand kompensiert die pharyngeale Muskulatur die obstruierenden Kräfte und stabilisiert die Atmung. Im Schlaf nimmt der Muskeltonus der Atemwegsdilatatoren ab und die Aktivierung der Pharynx- und Zwerchfellmuskulatur ist nicht optimal synchronisiert. Die Folge ist ein intermittierendes teilweises oder vollständiges Kollabieren der oberen Atemwege. Durch die erhöhte Atemanstrengung, den Anstieg des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks und den Abfall des Sauerstoffpartialdrucks kommt es zu Weckreaktionen.

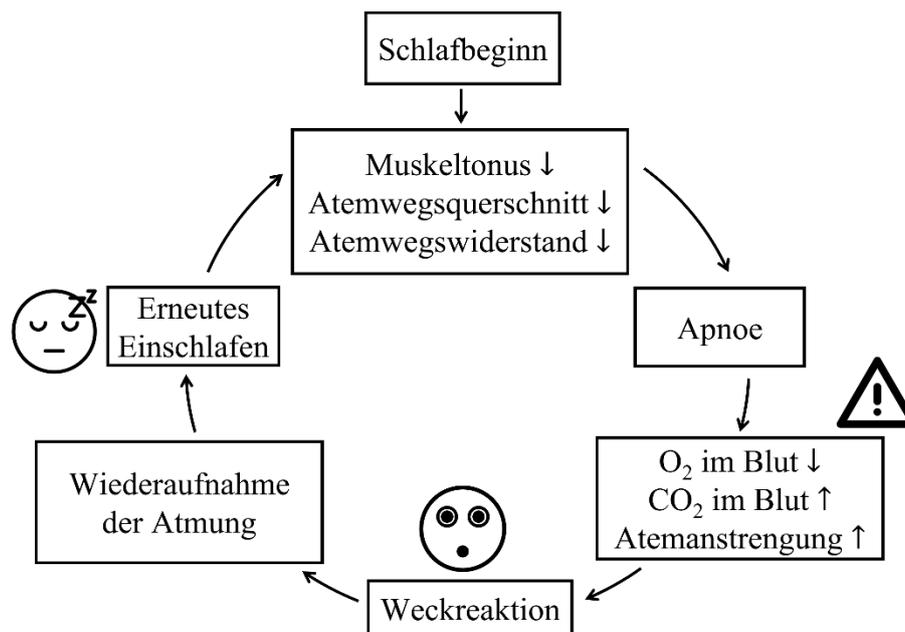


Abbildung 1: nächtlicher Zyklus der obstruktiven Schlafapnoe

Neben den anatomischen Faktoren können bei vielen Patienten auch weitere, sogenannte „nicht-anatomische“ Faktoren in unterschiedlichem Ausmaß ein OSAS beeinflussen. Dazu gehören eine beeinträchtigte Funktion der oberen Atemwegsdilatatoren während des Schlafes¹⁹, ein niedriger Schwellenwert für respiratorische Arousal²¹ und eine instabile Atemkontrolle („high loop gain“)¹⁵.

Risikofaktoren für das OSAS sind Zustände, die den pharyngealen Atemweg einengen. Zu den primären Risikofaktoren für die Entwicklung eines OSAS gehören neben Adipositas, welcher

den größten Einfluss liefert, männliches Geschlecht, höheres Alter (≥ 65 Jahre), ethnische Zugehörigkeit, kraniofaziale Anomalien, Menopause, erhöhter Alkoholkonsum und Nikotinabusus.¹⁷⁻¹⁹ Es wird geschätzt, dass 70% aller Patienten mit OSAS davon betroffen sind. Umgekehrt leiden etwa 40% der Patienten mit einem BMI ≥ 30 an dieser Erkrankung.²⁰ Daten aus verschiedenen Studien weisen zudem auf eine genetische Prädisposition hin.^{21,22}

2.2.4 Therapie

Die Therapie des OSAS wird derzeit allen Patienten mit einem AHI $\geq 15/h$ oder einem AHI zwischen 5-15/h in Kombination mit Symptomen wie Tagesmüdigkeit, Abgeschlagenheit, Wahrnehmungsstörungen, Konzentrationsstörungen oder begleitenden kardiovaskulären Erkrankungen empfohlen.²³ Die Therapieoptionen umfassen zum einen operative Verfahren, wie die Uvulopalatopharyngoplastik (UPPP), die maxillomandibuläre Vorverlagerung oder die Hypoglossusnervstimulation, zum anderen konservative Verfahren wie die Überdruckbeatmung, die Anwendung oraler Apparaturen oder die Änderung des Lebensstils. Zur Evaluation des Therapieerfolgs werden Indikatoren wie AHI, Compliance, Patientenzufriedenheit, Grad der Tagesmüdigkeit, gemessen mit der „Epworth Sleepiness Scale“ (ESS)²⁴ oder dem „multiple wakefulness test“²⁵, untersucht.

Die Standardtherapie des OSAS, insbesondere bei mittelschwerer bis schwerer Ausprägung, ist die kontinuierliche Überdruckbeatmung („continuous positive airway pressure“, CPAP) über eine Nasen-, Mund-, oder Nasen-Mund-Maske.²⁶ Bei regelmäßiger Anwendung kann dies zu einer Verbesserung der Tagesmüdigkeit und Lebensqualität²⁷, einer Verbesserung der kardiovaskulären Gesundheit²⁸⁻³⁰ und einer Verminderung des AHI²³ führen.

Eine weitere Therapieoption ist die Verwendung von oralen Schienen. Sie werden von der *American Academy of Sleep Medicine* (AASM) für Patienten mit leichtem bis mittelschwerem OSAS empfohlen, wenn diese eine CPAP-Therapie ablehnen.³¹ Bisschienen werden von den meisten Patienten gegenüber einer CPAP-Therapie oder operativen Verfahren bevorzugt, die Therapieadhärenz ist mit 40 bis 80% deutlich besser als bei der CPAP-Therapie.³² Hinsichtlich der Blutdrucksenkung kann die Schienentherapie ähnlich gute Ergebnisse wie die CPAP-Therapie erzielen.³³ Insbesondere bei mittelschwerem bis schwerem OSAS ist jedoch die CPAP-Therapie hinsichtlich AHI, Arousal-Index und Sauerstoffentsättigung effektiver.³⁴

Die etablierteste chirurgische Intervention ist die UPPP, bei der Weichgewebe des hinteren Pharynx, des weichen Gaumens, eines Teils der Uvula und der Tonsillen entfernt wird, um den oropharyngealen Raum in transversaler und sagittaler Richtung zu erweitern.⁶ In einer randomisierten kontrollierten klinischen Studie aus dem Jahr 2016 konnte gezeigt werden, dass

der AHI bei > 90% der operierten Patienten durch die UPPP reduziert werden konnte.³⁵ Ein weiteres operatives Verfahren zur Therapie des OSAS ist die maxillo-mandibuläre Vorverlagerung (*maxillo-mandibular advancement*, MMA). Gemäß der S3-Leitlinie wird die MMA bei anatomischen Befunden, wie hyperplastischem Unterkiefer und engem Gesichtsschädel empfohlen. Insbesondere bei Patienten, bei denen andere Therapien (CPAP, Unterkieferprotrusionsschienen) nicht möglich sind oder nicht toleriert werden, kann die MMA zum gewünschten Erfolg führen.

Eine neue chirurgische Methode zur Behandlung des OSAS ist die selektive elektrische Stimulation des Nervus hypoglossus, der den wichtigsten Atemwegsöffner, den M. genioglossus, innerviert. Ziel ist es, die insuffiziente Tonisierung der Pharynxmuskulatur während des Schlafes wiederherzustellen. In einer großen multizentrischen Studie mit 508 Patienten konnte 12 Monate nach Implantation eine Reduktion des durchschnittlichen AHI von 36/h auf 10/h festgestellt werden.³⁶ Es zeigten sich anhaltende Effekte hinsichtlich der Reduktion respiratorischer Ereignisse bei mittelschwerem bis schwerem OSAS. Auch die Therapieadhärenz war sehr hoch. Insgesamt konnte eine signifikante Verbesserung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität festgestellt werden.

2.2.5 Kardiovaskuläres Risiko von OSAS-Patienten

Das OSAS ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie und weiterer kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Herzinsuffizienz, koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt oder Herzrhythmusstörungen.³⁷⁻⁴⁰ Die *Wisconsin Sleep Cohort Study* konnte unabhängig von anderen Risikofaktoren (Geschlecht, Alter, BMI) einen linearen Anstieg des Blutdrucks mit zunehmendem Schweregrad des OSAS nachweisen.⁴¹ Das erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei Patienten mit OSAS ist vermutlich auf den bei OSAS häufig vorliegenden Bluthochdruck zurückzuführen. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen OSAS und Arteriosklerose nachgewiesen werden.⁴²

Mehrere zusammenhängende Pathomechanismen tragen zur Hypertonie und zu kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit OSAS bei (Abbildung 2). In einem Experiment wurden Menschen periodischen Hypoxien ausgesetzt, wobei ein Anstieg des Blutdrucks und des Hirngefäßwiderstands gemessen wurde.⁴³ Dementsprechend treten auch beim OSAS Hypoxieepisoden durch wiederkehrende Apnoephasen auf, die durch verschiedene vegetative, hämodynamische und biochemische Veränderungen zum Pathomechanismus der Hypertonie und der kardiovaskulären Ereignisse beitragen.²

Bei Patienten mit OSAS ist die Aktivität des sympathischen Nervensystems sowohl beim Schlafen als auch tagsüber erhöht.⁴⁴ Dies führt zu einem erhöhten Gefäßwiderstand und vaskulärem Remodeling, was wiederum zum Anstieg des Blutdrucks beiträgt.⁴⁵ Darüber hinaus führt repetitive Hypoxie auch zu oxidativem Stress mit endothelialer Dysfunktion, einem frühen Marker für Gefäßschäden, die klinisch messbaren Gefäßerkrankungen vorausgehen. Die endotheliale Dysfunktion könnte daher eine wichtige Ursache für das erhöhte kardiovaskuläre Risiko bei OSA-Patienten sein.⁴⁶

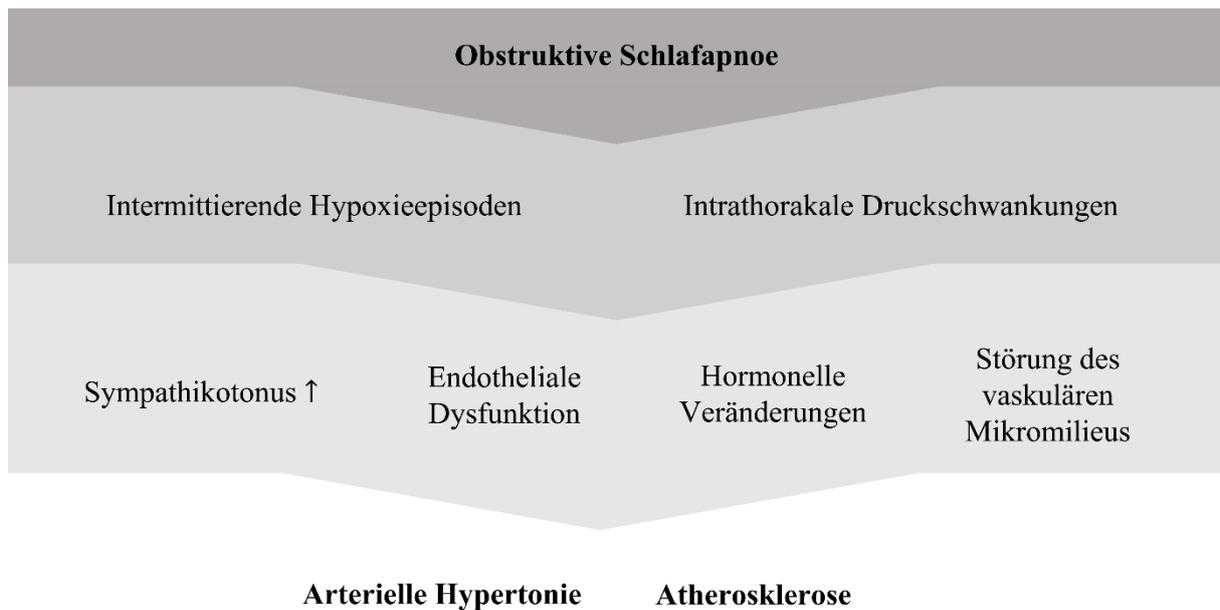


Abbildung 2: Pathomechanismus der OSA im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen

2.3 Long non-coding RNA

Long non-coding RNA (lncRNA) ist definiert als RNA, die nicht in funktionelle Proteine translatiert wird und eine Länge von >200 Nukleotiden aufweist.³ Diese sehr weit gefasste Definition umfasst eine große und sehr heterogene Gruppe von Transkripten, die sich in ihrer Biogenese und ihrem genomischen Ursprung unterscheiden.

Während der Einfluss kleiner non-coding RNAs wie microRNAs (miRNAs) auf die Regulation physiologischer und pathologischer Zellfunktionen bereits eingehend untersucht wurde, stehen Studien zu lncRNAs noch am Anfang.⁴⁷ Die Anzahl der lncRNA-Gene im menschlichen Genom wird von der *Human GENCODE* Statistik auf ca. 16.000 geschätzt, andere Statistiken kommen zu Schätzungen von über 100.000 Genen.^{48,49}

Die genaue Anzahl der funktionellen lncRNAs ist noch nicht bekannt. Es werden jedoch immer mehr lncRNAs identifiziert, die eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen spielen. Viele von ihnen beeinflussen die Genexpression über unterschiedliche Mechanismen. Je nach

Lokalisation im Zellkern oder im Zytoplasma der Zelle beeinflussen sie die Transkription oder die post-transkriptionelle Genregulation. So wird z. B. die Transkription benachbarter Gene durch im Zellkern lokalisierte lncRNAs kontrolliert, aber auch die DNA-Replikation oder die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden und deren Reparatur können durch sie beeinflusst werden. lncRNAs im Zytoplasma hingegen können mit mRNAs oder miRNAs auf verschiedenen Wegen interagieren, z.B. beim Splicing, bei der Translation oder in Signalwegen. Einige lncRNAs fungieren auch als Gerüst für Proteinkomplexe.^{50,51} Somit steuern lncRNAs verschiedene zelluläre Funktionen mit zum Teil hoher physiologischer Relevanz (Abbildung 3).

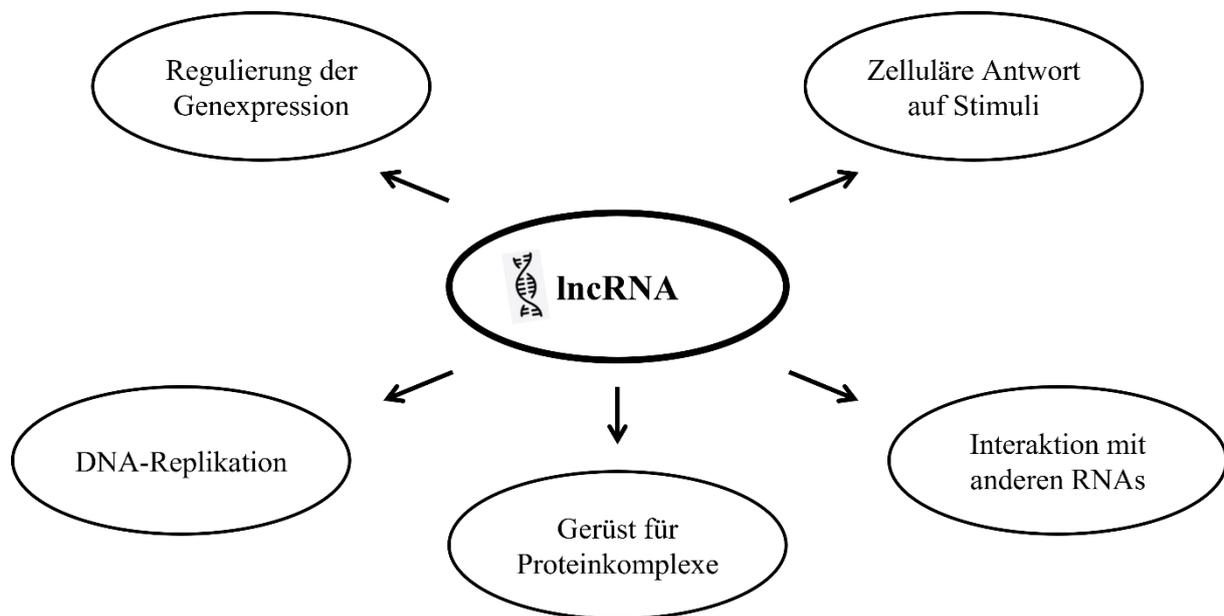


Abbildung 3: Funktionen von lncRNAs

Veränderungen ihrer Expression sind mit vielen verschiedenen Pathophysiologien verbunden. Durch verschiedene Einflüsse auf die Genregulation beeinflussen lncRNAs nicht nur die Zelldifferenzierung und das Zellwachstum, sondern auch die zelluläre Antwort auf Stress und Stimuli und können eine Schlüsselrolle bei Nerven-, Muskel-, Herz-Kreislauf-, Lipid-, Blut- und Immunerkrankungen und damit verbundenen Erkrankungen spielen.⁵²⁻⁵⁷

Das spezifische Expressionsmuster funktioneller lncRNAs macht sie als potenzielle Biomarker für Krankheiten interessant. Daher werden auch Strategien entwickelt, um sie als Angriffspunkte für therapeutische Ansätze zu nutzen.

2.3.1 lncRNA im Zusammenhang mit kardiovaskulären Krankheiten

Die Transkriptionsregulation von lncRNAs ist für jeden Zelltyp und jedes Entwicklungsstadium spezifisch, kann sich aber auch unter Stress oder pathologischen

Bedingungen verändern. Im kardiovaskulären System konnten zahlreiche Studien die veränderte Regulation bestimmter lncRNAs bei verschiedenen Herzerkrankungen nachweisen.⁵⁸⁻⁶² Auch die Beteiligung einiger lncRNAs an der embryonalen und kardialen Entwicklung konnte gezeigt werden, wie z.B. bei den lncRNAs *Fendrr* und *Braveheart*, welche an der Regulation der normalen Herzfunktion beteiligt sind.^{63,64}

Die pathologische Ursache von Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist in erster Linie die Atherosklerose. Dabei spielen lncRNAs eine wichtige Rolle. In einer Studie wurden die mit der koronaren Herzkrankheit assoziierten lncRNAs in atherosklerotischem und nicht-atherosklerotischem Gewebe gemessen und miteinander verglichen.⁶⁵ Dabei zeigte sich, dass die Expression von *ANRIL* und *MIAT* in atherosklerotischem Gewebe erhöht war, während die Expression von *MALAT1* verringert war. Aus diesen Ergebnissen schlossen ARSLAN et al. auf eine Rolle von lncRNAs bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit. Der Einfluss von *MALAT1* auf die Atherosklerose wurde in einem Experiment mit Mäusen weiter untersucht, wobei festgestellt wurde, dass verminderte Konzentrationen von *MALAT1* in den Leukozyten des peripheren Blutes die Bildung von atherosklerotischen Läsionen im Aortengewebe der Mäuse verstärkten. Diese Beobachtung wurde ebenfalls mit atherosklerotischen Erkrankungen beim Menschen in Verbindung gebracht.⁵⁸

In einer der ersten Studien zu funktionellen lncRNAs bei Herzhypertrophie konnte das lncRNA-Cluster *Mhrt* identifiziert werden.⁶⁶ Hier wurde bei Mäusen eine *Transverse Aortic Constriction* (TAC) durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass *Mhrt* dauerhaft herunterreguliert ist. Die induzierte Überexpression des lncRNA-Clusters führte in der Folge zu einer reduzierten Hypertrophie und Fibrose und einer verbesserten Herzfunktion im Vergleich zu TAC-operierten Mäusen ohne reaktiviertes *Mhrt*.

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass das lncRNA-Cluster *Chast* in hypertrophen Kardiomyozyten hochreguliert ist.⁵⁹ Durch Silencing von *Chast* konnte das hypertrophe Wachstum gestoppt und die Herzfunktion in TAC-operierten Mäusen erhalten werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *Chast* bei Patienten mit Aortenstenose hochreguliert ist. Hier tritt die Hypertrophie als Kompensation der erhöhten Nachlast auf. Dies deutet auf ein therapeutisches Potential zur Behandlung der kardialen Hypertrophie beim Menschen hin.

Ein weiteres Beispiel für eine prohypertrophe lncRNA ist *Chaer*. Diese ist in der Lage, die Regulation der Genexpression sehr präzise zu beeinflussen. *Chaer-Knockout*-Mäuse wurden einer TAC-Operation unterzogen. Daraufhin konnte im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe

eine reduzierte Herzhypertrophie, Fibrose sowie eine erhaltene Herzfunktion festgestellt werden.⁶⁰ Im Gegensatz dazu induzierte die Überexpression von *Chaer* ein hypertrophes Zellwachstum.

Auch beim Herzinfarkt konnte die wichtige Rolle von lncRNAs nachgewiesen werden. So wurden verschiedene Studien zur lncRNA *MIAT* durchgeführt. Erstmals erforscht wurde sie in einer Studie an einer japanischen Population im Jahr 2006, bei der sechs Einzelnukleotid-Polymorphismen im *MIAT*-Genlocus als Risikofaktor für einen Myokardinfarkt identifiziert werden konnten.⁶⁷ Darüber hinaus wirkt *MIAT* nach einem Myokardinfarkt pro-fibrotisch im kardialen Gewebe, wie im Versuch mit Mäusen gezeigt werden konnte.⁶¹ Durch den Verschluss der linken absteigenden Koronararterie wurde die Expression von *MIAT* im angrenzenden Infarktgewebe der Versuchstiere dauerhaft hochreguliert. Durch die negative Regulierung verschiedener anti-fibrotischer miRNAs (u.a. miR-24, miR-29, miR-30 und miR-133) führt diese lncRNA zu kardialer Fibrose und hemmt den Gewebeumbau nach einem Infarkt. Umgekehrt führte der knockdown von *MIAT* vor einem Infarkt zu einer Verringerung der Infarktgröße und Fibrose bei erhaltener Herzfunktion. Dass *MIAT* in Kardiomyozyten pro-fibrotisch wirkt, konnte in weiteren Publikationen bestätigt werden. Denn auch die Expression der anti-fibrotisch wirkenden miR-150 und miR-93 wird durch *MIAT* gehemmt.^{62,68}

Während eines Herzinfarktes kommt es durch Sauerstoffmangel im Gewebe zum nekrotischen und apoptotischen Zelltod von Kardiomyozyten. Zahlreiche Studien haben dazu den regulatorischen Einfluss von lncRNAs untersucht. Beispielsweise waren die lncRNAs *Carl* und *Mdrl* nach einem Infarkt herunterreguliert.^{69,70} Eine Überexpression dieser lncRNAs führte zu einer Hemmung der pro-apoptotischen miRNAs miR-539 oder miR-361, was zu einer geringeren Infarktgröße führte. Ähnlich zeigte die lncRNA *Ftx* anti-apoptotisches Potential durch die Regulation von miR-29b-1-5p und Bcl2l2.⁷¹

Wie bereits erwähnt, nehmen lncRNAs eine wichtige Rolle in der Regulation des pathologischen Zellwachstums von Kardiomyozyten, der Fibrose und der Apoptose in Infarkt- und hypertrophem Herzgewebe ein. Durch Beeinflussung der Genregulation, Hemmung oder Aktivierung der Transkription oder direkte Interaktion mit Proteinen oder anderen nicht-kodierenden RNAs beeinflussen lncRNAs intrazelluläre Signalwege bei einer Reihe von Herzerkrankungen. Darüber hinaus können lncRNAs auch die interzelluläre Kommunikation beeinflussen, indem sie die parakrine Signaltransduktion modulieren. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die lncRNA *Mirt1* an der akuten Entzündungsreaktion nach einem Myokardinfarkt beteiligt ist.⁷² Chronische intermittierende Hypoxie (CIH) ist das

Hauptmerkmal der OSA und kann bekanntermaßen das kardiale Remodeling nach einem Myokardinfarkt verstärken. Die hypoxieinduzierte erhöhte Expression von *Mirt1* erleichterte den zellulären Transport des Transkriptionsfaktors NF-κB und die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1β und TNF-α. Diese erhöhte Sekretion wiederum führte zur Apoptose von Kardiomyozyten und zur Infiltration von Makrophagen in das Infarktgewebe. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen WANG et al. in ihrer Studie aus dem Jahr 2022.⁷³ Hier wurde untersucht, wie das kardiale *Remodeling* nach einem Myokardinfarkt durch CIH reguliert wird. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden 345 lncRNAs fehlreguliert. *Mirt1* wurde als wahrscheinlich wichtigster Regulator während des durch CIH verstärkten Remodelings identifiziert.

2.3.2 lncRNA als Biomarker

lncRNAs können sowohl die intra- als auch die interzelluläre Kommunikation beeinflussen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass lncRNAs in extrazellulären Körperflüssigkeiten wie Blutplasma oder Urin nachweisbar sind und dynamische Veränderungen im Krankheitsverlauf widerspiegeln.⁷⁴⁻⁷⁶ Sie gelangen in Exosomen, extrazellulären Vesikeln oder in apoptotischen Körperchen in die Blutbahn.^{77,78} Die Stabilität im Kreislauf kann aber auch durch die Assoziation mit Proteinen erreicht werden. Diese Langzeitstabilität in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten macht lncRNAs neben der Tatsache, dass sie ein krankheitsspezifisches Häufigkeitsmuster aufweisen, sehr interessant für die nicht-invasive Prognostik und Diagnostik.

Ein bekanntes Beispiel für eine lncRNA, die als Biomarker fungieren kann, ist die mitochondrial abgeleitete *LIPCAR*. Ihre Plasmawerte sind mit einem linksventrikulären Remodeling nach Myokardinfarkt und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz assoziiert.⁷⁹ Erhöhte zirkulierende *LIPCAR*-Werte waren auch mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskulären Tod bei chronischer Herzinsuffizienz verbunden. In einer 2-Jahres-Follow-up-Studie wurde außerdem festgestellt, dass *LIPCAR* auch ein unabhängiger Risikofaktor für diastolische Dysfunktion bei Patienten mit Typ-2-Diabetes ist.⁷⁹ In derselben Studie wurden auch die anderen lncRNAs *MIAT* und *SENCR* mit dem linksventrikulären Remodeling in Verbindung gebracht. Darüber hinaus waren die Plasmakonzentrationen der lncRNAs *LIPCAR* und *H19* bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit erhöht, insbesondere bei denen mit begleitender chronischer Herzinsuffizienz.⁸⁰ Andere Studien identifizierten die lncRNAs *NRON* und *MHRT* als weitere unabhängige Prädiktoren für Herzinsuffizienz und

erhöhte Plasmawerte von *ANRIL* wurden mit einem erhöhten Risiko für Restenose in Verbindung gebracht.^{81,82}

Die Möglichkeit, lncRNAs in extrazellulären Körperflüssigkeiten nachzuweisen, erweitert den Katalog prognostischer und diagnostischer Biomarker für Herz-Kreislauf- und andere Erkrankungen um einen großen Pool von Molekülen.^{78,83}

2.3.3 lncRNA in der Therapie

Aufgrund der gewebespezifischen Expression von lncRNAs und der oft sehr spezifischen Regulation von Zielgenen stellen lncRNAs potenzielle therapeutische Ansatzpunkte dar. Die herzspezifische Modulation einiger lncRNAs birgt das Potenzial, die kardiale Dysfunktion zu verbessern oder pathologische Prozesse bei kardiovaskulären Erkrankungen zu reduzieren. Voraussetzung ist, dass die lncRNAs *in vivo* reguliert werden können.

Typische Therapeutika wirken als Hemmstoffe. Inhibierte lncRNAs wiederum können zur Hochregulation von Genen führen. Das *Silencing* von RNA-Molekülen kann mit Hilfe von sequenzspezifischen Antisense-Oligonukleotiden (ASO) oder RNA-Interferenz-Methoden (RNAi) durchgeführt werden. ASOs sind kurze einzelsträngige Nukleotide, die durch komplementäre Basenpaarung an die Ziel-RNA binden und diese dadurch stilllegen. Bei der RNAi binden kurze RNA-Moleküle, sogenannte *small interfering RNAs* (siRNAs), unter Beteiligung mehrerer Enzymkomplexe an die spezifische Ziel-RNA, wodurch die normale Funktion der Ziel-RNA ausgeschaltet wird. Die medikamentöse Antisense-Therapie konnte in klinischen Studien bereits erfolgreich zur Stilllegung von Protein-kodierenden mRNAs eingesetzt werden, z. B. mit einem bereits auf dem Markt befindlichen Präparat gegen familiäre Hypercholesterinämie (Mipomersen) oder einem Medikament zur Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie (Eteplirsen).⁸⁴⁻⁸⁷ In Abhängigkeit ihrer Funktion befinden sich lncRNAs jedoch entweder im Zytoplasma oder im Zellkern. Dies muss bei der therapeutischen Strategie berücksichtigt werden. SiRNAs beispielsweise wirken hauptsächlich im Zytoplasma und sind daher weniger effektiv gegenüber lncRNAs im Zellkern.⁸⁸ Die vielversprechendsten ASOs für das medikamentöse Silencing von lncRNAs sind derzeit GapmeRs. Sie sind in der Lage, in den Zellkern einzudringen und dort lokalisierte Moleküle zu modulieren.⁸⁹ Bisher wurden dazu noch keine klinischen Studien am Menschen durchgeführt. Therapeutische Injektionen von GapmeRs in Mäuse, die an Bluthochdruck oder Herzinfarkt litten, zeigten jedoch vielversprechende Ergebnisse.^{59,90,91} Die kardiale Gesundheit konnte signifikant verbessert werden. Dies deutet auf ein großes Potenzial der Antisense-Arzneimitteltherapie gegen

lncRNAs hin. Allerdings könnten die Oligonukleotide hepatotoxisch sein, weshalb weitere chemische Modifikationen dieser neuen Medikamentenklasse erforderlich wären.^{89,92}

2.4 Einfluss des OSAS auf das lncRNA-Profil

Für diese Studie ist zusätzlich von Interesse, welchen Einfluss das OSAS auf das lncRNA-Profil hat. Bei der Schlafapnoe kommt es während der Nacht aufgrund von Atemstillständen zu intermittierenden Hypoxien. Diese können das Expressionsmuster einiger lncRNAs beeinflussen, wie zum Beispiel der lncRNA *MALATI*. Sie wird in Endothelzellen stark exprimiert und steht in engem Zusammenhang mit der Endothelfunktion.^{93,94} Es konnte gezeigt werden, dass ihre Expression in hypoxischen Endothelzellen erhöht ist und sie die Proliferation der Endothelzellen hemmt.

In der Studie von CHEN et al. wurde der Mechanismus der OSA-bedingten Atherosklerose untersucht, indem Endothelzellen der menschlichen Umbilikalvene intermittierender Hypoxie ausgesetzt wurden und die Expression von *MALATI* bestimmt wurde.⁹⁵ Es wurde gezeigt, dass *MALATI* eine schützende Funktion bei der Schädigung von Endothelzellen durch intermittierende Hypoxie hat. Die intermittierende Hypoxie verschlechterte die Zellgesundheit und erhöhte die Zellapoptose. *MALATI* war in den mit intermittierender Hypoxie behandelten Endothelzellen signifikant hochreguliert. Ein Knockdown von *MALATI* verstärkte sich die Zellschädigung, die wiederum durch Hemmung von miR-142-3p unterdrückt werden konnte. Zudem konnte gezeigt werden, dass HMGB1 direkt mit miR-142-3p interagiert und *MALATI* HMGB1 über miR-142-3p reguliert. In Endothelzellen, die intermittierender Hypoxie ausgesetzt waren, erzielte *MALATI* seine Wirkung also über die Regulation von miR-142-3p und HMGB1.

In einer früheren Studie dieser Autoren konnte bereits gezeigt werden, dass chronische intermittierende Hypoxie das Expressionsmuster einiger lncRNAs verändert.⁹⁶ Ratten wurden einer intermittierenden Hypoxie ausgesetzt, woraufhin im linksventrikulären Myokardgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe 157 lncRNAs hochreguliert und 132 herunterreguliert wurden.⁹⁶ Dies deutet auf eine Beteiligung verschiedener lncRNAs an der Pathogenese OSA-induzierter kardiovaskulärer Erkrankungen hin.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellkultivierung

- Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAECs); Artikel-Nr.: C-12221; PromoCell
- Endothelial Cell Growth Medium MV; Artikel-Nr.: C-22020; PromoCell

3.1.2 RNA-Isolation

- miRNeasy Serum/Plasma Kit; Artikel-Nr.: 217184; Qiagen
- TRIzol Reagenz; Artikel-Nr.: 15596026; Invitrogen
- Chloroform; Artikel-Nr.: C2432-1L; Sigma

3.1.3 RNA-Sequenzierung

- Next Single Cell/Low Input RNA Kit; Artikel-Nr.: E6420; NEB
- TapeStation 4200; Agilent
- Qubit Assay; Thermo Fisher Scientific
- NovaSeq 6000; Illumina

3.1.4 qPCR

- Omniscript Reverse Transcription Kit; Artikel-Nr.: 205111; Qiagen
- TaqMan Gene Expression Master Mix; Thermo Fisher Scientific
- TaqMan probes
 - MRPL20-AS1; Artikel-Nr.: 4351372; Assay-ID: Hs05041758_s1
 - GAPDH; Artikel-Nr.: 4331182; Assay ID: Hs02786624_g1

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Menschliche Koronararterienzellen (human coronary artery endothelial cells, HCAECs; Promocell, Heidelberg, Germany, Cat# C-12221) wurden unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂, 100% relative Luftfeuchtigkeit und Sauerstoffkonzentration entsprechend der Umgebungsluft) kultiviert. Dazu wurde das Endothelzellnährmedium MV (Promocell, Heidelberg, Germany, Cat# C-22020) verwendet.⁹⁷

Um Hypoxie zu simulieren, wurden die HCAECs in einer InvivO2 Hypoxie-Workstation (Ruskinn) für 24 Stunden mit 1% bzw. 5% Sauerstoff inkubiert. Die Kontrollzellen wurden mit einer Sauerstoffkonzentration inkubiert, die der Umgebungsluft entsprach.

3.2.2 Rekrutierung und Probengewinnung

Die Probanden stammten aus einem Pool von Schlafapnoe-Patienten der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik der Uniklinik Köln. Ein Teil der Proben wurde bereits im Rahmen der Studie „Nächtliche Konzentrationsveränderungen zirkulierender microRNA bei Schlafapnoe-Patienten“ von Miriam von Krosigk, die ebenfalls von Frau Dr. Jansen betreut wurde, gesammelt und aufbereitet. Es wurden Proben von 23 Patienten untersucht. Alle Probanden verbrachten eine Nacht in der HNO-Klinik im Rahmen einer Schlafpolygrafie und Propofol-Schlafendoskopie. Diese Untersuchung war unabhängig von der vorliegenden Arbeit und diente ausschließlich der klinischen Indikationsstellung. Einschlusskriterium war das Vorliegen oder der begründete Verdacht auf ein OSAS, definiert nach der *International Classification of Sleep Disorders-3* (ICSD-3) mit einem AHI $\geq 15/h$ oder einem AHI $\geq 5/h$ in Kombination mit klinischer Symptomatik. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Nierenfunktionsstörungen, schweren Herzerkrankungen oder Malignomen. Die Patienten wurden zuvor ausführlich mündlich und schriftlich aufgeklärt und willigten ein, während ihres Klinikaufenthaltes zwei zusätzliche Blutproben für diese Studie abzugeben.

Nach schriftlicher Einwilligung erfolgte die erste venöse Blutentnahme abends gegen 20:30 Uhr, die zweite am nächsten Morgen gegen 08:00 Uhr. Es wurden jeweils 19,7 ml Blut in Form von fünf Citratröhrchen á 3 ml und einem Serumröhrchen á 4,7 ml entnommen.

Die Ethikkommission der Universitätsklinik Köln hat dem Forschungsvorhaben zugestimmt (19/425).

3.2.3 Probenverarbeitung

Die Isolierung des zellfreien Plasmas erfolgte unmittelbar nach der Blutentnahme und unter ständiger Kühlung. Dazu wurden die Proben insgesamt dreimal nach dem folgenden Schema zentrifugiert:

1. 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 3.000 rpm
2. 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 2.500 rpm
3. 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 2.500 rpm

Zwischen den Zentrifugationszyklen wurden Sediment und Überstand voneinander getrennt. Der Überstand wurde weiterverarbeitet, das Sediment verworfen. Das verbleibende Plasma

bzw. Serum wurde anschließend in 1,5 ml Eppendorf Tubes® bei -80°C eingefroren und bis zum Transport ins Labor der Molekularen Kardiologie der Uniklinik Bonn im Gefrierschrank gelagert.

3.2.4 RNA-Isolation

Vor der Weiterverarbeitung des Humanplasmas wurden die Proben im Labor aufgetaut. Anschließend wurde die RNA aus den Blutproben mit dem miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Cat# 217184) isoliert.

Die RNA der HCAECs wurde unter Verwendung von Trizol (Invitrogen, Cat# 15596026) und Chloroform isoliert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in Trizol lysiert. Die RNA wurde mit Chloroform isoliert, mit Isopropanol ausgefällt, zweimal mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser resuspendiert. Die getrennte Isolierung von nukleärer und zytoplasmatischer RNA erfolgte unter Verwendung des Kits zur Reinigung von zytoplasmatischer und nuklearer RNA (Norgen Biotek, Cat. # 37400) gemäß Herstellerprotokoll. Die Qualität und Konzentration der RNA wurde mittels Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

3.2.5 RNA-Sequenzierung

Für die RNA-Sequenzierung wurden 1 bis 4,5 ng der gesamten RNA für die Bibliotheksvorbereitung mit dem Next Single Cell/Low Input RNA Kit (NEB, Cat# E6420) verwendet, wie vom Hersteller empfohlen, einschließlich rRNA-Depletion. Qualitätskontrolle und Quantifizierung wurden mit TapeStation 4200 (Agilent) und Qubit Assay (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte auf dem NovaSeq 6000 unter Verwendung einer SP 200 Flowcell und einer Leselänge von 2x100 bp.

3.2.6 qPCR-Analyse

Zur Bestimmung der zu quantifizierenden lncRNAs wurden vier Probanden mit besonders hohem AHI ausgewählt. Das Plasma dieser Patienten wurde einer Transkriptomanalyse mittels *paired-end RNA sequencing* unterzogen und die Konzentrationen am Abend und am Morgen verglichen. Die am stärksten regulierte lncRNA wurde für die weitere Analyse ausgewählt und das Kodierungspotential dieser RNA mit dem *Coding Potential Assessment Tool in silico* bestimmt. Anschließend wurde die lncRNA mittels *Real-Time-qPCR* in jeder Patientenprobe einzeln quantifiziert, wie im Folgenden beschrieben.

Für die Einzel-PCR-Analyse wurden 0,5 μg RNA durch reverse Transkription mit dem Omniscript RT Kit (Qiagen, Cat# 205111) gemäß Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben.

Für die Analyse der Patientenblutproben wurden 0,1 µg RNA für die reverse Transkription verwendet.

Die so gewonnene cDNA wurde mit dem Taqman Gene Expression Master Mix und Taqman Proben der Firma Thermo Fisher Scientific amplifiziert: Probe für *MRPL20-ASI* Cat# 4351372, Assay ID Hs05041758_s1; *GAPDH*, Cat# 4331182, Assay ID Hs02786624_g1; in einem Quant Studio 3 (Thermo Fisher Scientific). *GAPDH* wurde als interne Kontrolle verwendet. Die relative Expression wurde mit $2^{-\Delta\Delta CT}$ berechnet.

3.2.7 Auswertung

Die Sequenzierungsdaten wurden unter Verwendung der RNAseq-Datenvorverarbeitung mit der nf-core RNA-seq-Pipeline, Version v1.4.2, mit Standardeinstellungen analysiert. Die Kartierung und Quantifizierung der Genome wurde mit den Tools STAR und featureCounts durchgeführt. Die statistische Analyse der resultierenden Daten erfolgte in der R-Umgebung (R Version 3.6) unter Verwendung eines intern entwickelten Workflows mit dem DESeq2-Paket als Kern.

Gene mit niedrigen Werten wurden vor der Analyse entfernt. Nur Gene mit einem Wert von mindestens drei in mindestens drei Proben wurden in den Arbeitsablauf aufgenommen. Ein einfaktorieller Versuchsplan wurde gewählt, um paarweise Kontraste für die Studienbedingungen zu konstruieren.

Die Mittelwerte zweier Gruppen wurden mit einem ungepaarten t-Test verglichen. Die Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen wurden mittels einfaktorieller ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test verglichen. Die lncRNAs wurden mit Hilfe von ensembl! Biomart identifiziert. Die Bewertung des kodierenden Potenzials von *MRPL-20ASI* erfolgte mit dem Kodierungspotenzial-Bewertungstools CPAT.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Patientencharakteristik

In der vorliegenden Studie wurden Proben von 23 Patienten, die unter OSAS leiden, in Hinsicht auf deren lncRNA-Expression untersucht. Ein Proband wurde aufgrund eines AHI unter 5/h von der Studie ausgeschlossen. Von den verbleibenden 22 Probanden waren 19 männlich und 3 weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 44,5 Jahre.

Bereits bestehende kardiovaskuläre Risikofaktoren traten nur bei sechs der Probanden auf: fünf Patienten hatten Bluthochdruck, ein Patient litt an einer koronaren Herzkrankheit. Vier Patienten gaben an, Raucher zu sein, definiert als 5-20 packyears.

Die meisten Probanden dieser Studie waren übergewichtig, sieben Patienten mit einem BMI $>30 \text{ kg/m}^2$ sogar adipös. Nur vier Patienten waren mit einem BMI $<25 \text{ kg/m}^2$ als normalgewichtig einzustufen, der mittlere BMI betrug $28,7 \pm 4,7 \text{ kg/m}^2$.

Der mittlere ESS lag bei 9,9. Die Polygraphie, der sich die Patienten während ihres Aufenthaltes in der HNO-Klinik unterzogen, ergab bei vier Patienten eine leichte OSA (AHI 5-15/h). Bei acht Patienten wurde eine mittelschwere OSA (15-30/h) diagnostiziert, während zehn Patienten an einer schweren OSA ($>30/h$) litten. Der mittlere AHI betrug somit $28,4 \pm 14,7/h$. Der mittlere Sauerstoff-Entsättigungs-Index (ODI) lag bei 21,7/h mit der niedrigsten Sauerstoffsättigung von 79,1%.

4.2 MRPL20-ASI-Konzentrationsunterschiede

Zu Beginn wurde mit dem Blutplasma von vier Patienten, die einen besonders hohen AHI von durchschnittlich $36,6 \pm 3,9/h$ aufwiesen, eine Transkriptomanalyse mittels *paired-end RNA sequencing* vor und nach einer polygraphisch überwachten Nacht durchgeführt (Abbildung 4). Bei diesen vier Patienten lag der ODI bei $31,3 \pm 5,7/h$ und die mittlere Sauerstoffentsättigungszeit bei 13 min/h. Insgesamt wurden 5827 Transkripte identifiziert, von denen 124 signifikant dysreguliert waren. Von diesen 124 Transkripten waren drei nicht kodierend: *LOC102724098*, *MRPL20-ASI* und *RAD51L3-RFFL*. *MRPL20-ASI* war am stärksten fehlreguliert und wurde daher für die weiteren Analysen ausgewählt.

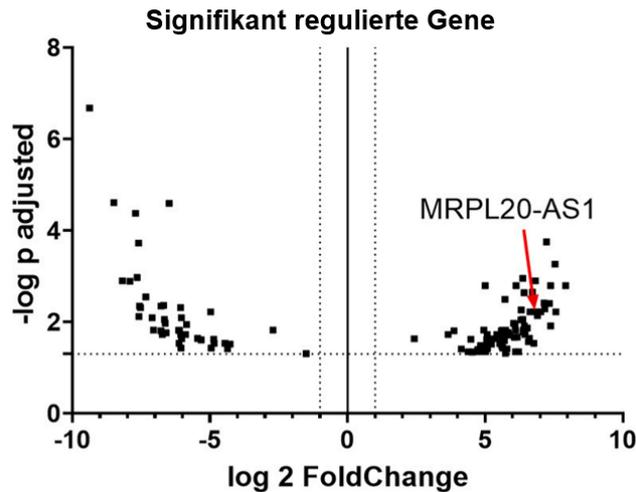


Abbildung 4: Analyse der Gesamt-RNA-Sequenzierung von vier OSAS-Patienten mit besonders hohem AHI, vor und nach einer polygraphisch überwachten Nacht; in Anlehnung an ZIETZER et al.⁹⁸

Zunächst wurde das Kodierungspotential dieser RNA *in silico* mit Hilfe des „Coding Potential Assesment Tools“ bestimmt. Dieses war mit einer berechneten Kodierungswahrscheinlichkeit von 0.06148 sehr gering.

In der qPCR-Analyse wurde *MRPL20-AS1* in 19 von insgesamt 22 Proben in hinreichenden Mengen nachgewiesen. Die Blutspiegel waren bei den meisten Patienten nach einer Nacht unter Polygraphie niedriger. Eine Korrelationsanalyse von *MRPL20-AS1* mit dem AHI zeigte, dass die Werte gegenläufig ansteigen bzw. abfallen (Abbildung 5). Die Korrelation mit dem ODI war dagegen nicht signifikant. Bei Patienten mit höherem AHI war die Konzentration von *MRPL20-AS1* im peripheren Blut nach einer polygraphisch überwachten Nacht niedriger.

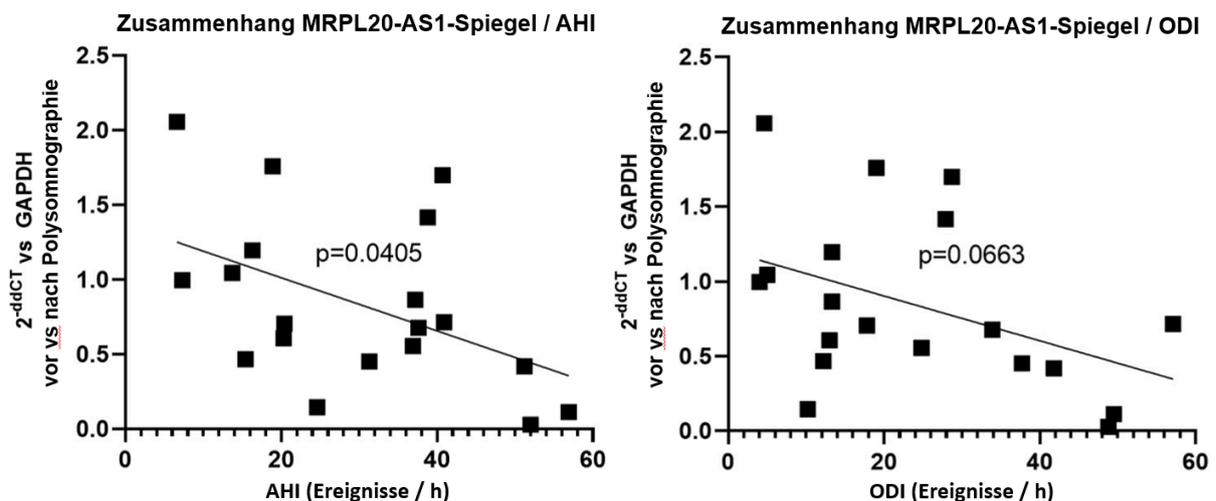


Abbildung 5: Korrelationsanalyse der *MRPL20-AS1*-Expression und des AHI / ODI bei OSAS-Patienten; n=19; in Anlehnung an ZIETZER et al.⁹⁸

In den humanen Koronararterienzellen waren die *MRPL20-AS1*-Konzentrationen sowohl unter 1%iger als auch unter 5%iger Sauerstoffkonzentration *in vitro* im Vergleich zu Normalbedingungen signifikant reduziert (Abbildung 6).

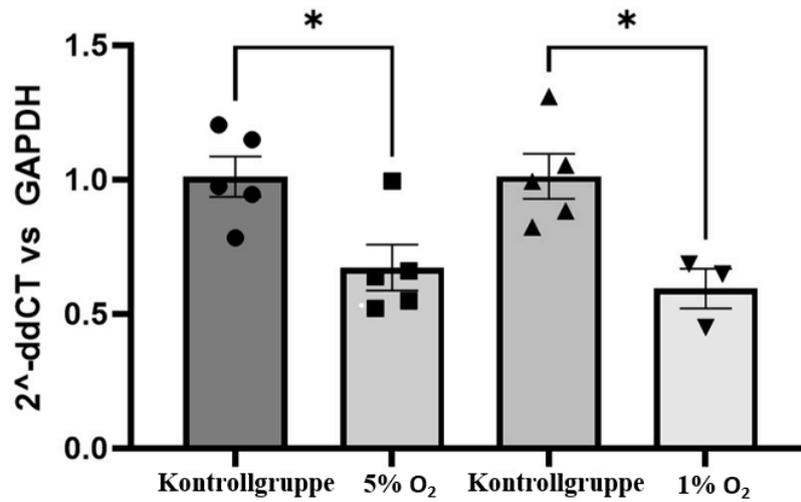


Abbildung 6: Relative Expression von *MRPL20-AS1* in HCAECs nach hypoxischer Schädigung ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM); * $p < 0,05$; in Anlehnung an ZIETZER et al.⁹⁸

5 Diskussion

5.1 Interpretation von lncRNA-Konzentrationsunterschieden in der vorliegenden Studie

OSA ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen. Die pathophysiologischen Zusammenhänge sind sehr komplex und noch nicht vollständig geklärt, wobei die endotheliale Dysfunktion eine wesentliche Rolle spielt. Die Möglichkeiten, den kausalen Zusammenhang zwischen OSA und kardiovaskulären Erkrankungen beim Menschen zu untersuchen, sind bisher begrenzt.⁹⁶ Dies liegt zum einen daran, dass OSA-Patienten häufig noch zusätzliche Risikofaktoren wie Übergewicht, Rauchen oder Diabetes mellitus aufweisen. Zum anderen dauert es oft mehrere Jahre, bis kardiovaskuläre Erkrankungen bei OSA-Patienten klinisch diagnostiziert werden. Darüber hinaus ist es weder einfach noch ethisch vertretbar, bei diesen Patienten invasivere Verfahren durchzuführen.

Ziel dieser Studie war es, den Zusammenhang zwischen OSA und kardiovaskulären Erkrankungen weiter zu erforschen. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass lncRNAs bei verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielen.⁹⁹ Nun sollte einerseits geklärt werden, wie das kardiovaskuläre Risiko von OSAS-Patienten durch lncRNAs beeinflusst wird, andererseits sollten die Ergebnisse helfen, in einem größeren Kontext Rückschlüsse auf Erklärungs- und Therapieansätze ziehen zu können.

Diese umfassende Studie zur Konzentration von lncRNAs im peripheren Blut von OSAS-Patienten vor und nach einer polygraphisch überwachten Nacht war eine der ersten. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen einer Reduktion der im peripheren Blut zirkulierenden lncRNA *MRPL20-AS1* über Nacht und schwerer OSA festgestellt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von *MRPL20-AS1* in Endothelzellen *in vitro* unter Hypoxie herunterreguliert wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass OSA-induzierte CIH die Sekretion von lncRNAs direkt beeinflusst.

Bisher gibt es nur wenige Studien zu lncRNAs im Zusammenhang mit OSA, die ebenfalls feststellen konnten, dass CIH einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation verschiedener lncRNAs hat. Beispielsweise konnten CHEN et al. zeigen, dass verschiedene lncRNAs, darunter *MALAT1*, durch intermittierende Hypoxie *in vitro* dysreguliert werden.^{95,96} Da diese lncRNA eine entscheidende Rolle in der Funktion hypoxisch gestresster Endothelzellen spielt, schlossen die Autoren auf einen Zusammenhang mit Atherosklerose, der Ursache kardiovaskulärer

Erkrankungen bei OSAS-Patienten. In einer anderen Studie wurde *Mirt1* als wahrscheinlich wichtigster Regulator während des kardialen Remodelings nach Myokardinfarkt identifiziert, das durch CIH verstärkt wird.⁷³ Darüber hinaus konnten LI et al. zeigen, dass die Expression von *Mirt1* durch CIH verstärkt wird.⁷²

5.2 Einfluss von *MRPL20-AS1* auf das kardiovaskuläre Risiko

5.2.1 Kardiovaskuläres Risiko von OSAS-Patienten

Das OSAS gilt als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Hypertonie und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt oder Herzrhythmusstörungen.³⁷⁻⁴⁰ Dies ist seit längerem bekannt, auch wenn der zugrunde liegende Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Die Bedeutung von lncRNAs in diesem Zusammenhang liegt aufgrund der zuvor genannten Studien nahe. Ein genaueres Verständnis des Pathomechanismus und sowohl der Ursachen für das erhöhte kardiovaskuläre Risiko bei OSAS-Patienten als auch der Wirkung von lncRNAs dabei ist daher von großem Interesse.

Die Pathophysiologie der OSA-assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen ist durch ein komplexes Zusammenspiel neuraler, mechanischer, humoraler und hämodynamischer Faktoren gekennzeichnet. Die neurale Komponente ist durch eine erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems sowohl im Schlaf als auch tagsüber bei OSA-Patienten gekennzeichnet.⁴⁴ Dies führt zu einem erhöhten Gefäßwiderstand und vaskulärem Remodeling, was wiederum zu einem Anstieg des Blutdrucks beiträgt.⁴⁵ Darüber hinaus führt die Sympathikusaktivierung vermutlich auch über einen kontrainsulinären Effekt zu einer gesteigerten Insulinresistenz.¹⁰⁰ Der mechanische Einfluss äußert sich in intrathorakalen Druckschwankungen, die durch die nächtlich wiederkehrenden Apnoen verursacht werden. Während der Apnoen wurde ein negativer intrapleuraler Druck gemessen. Zu den hämodynamischen Faktoren gehören wiederholte Blutdruckanstiege im großen und kleinen Kreislauf während der Apnoephasen, die zu einem erhöhten Scherstress der Gefäßwände führen können. Eine spezifische Störung des vaskulären Mikromilieus lässt sich anhand verschiedener humoraler Parameter bzw. Biomarker nachweisen.¹⁰¹ Grundlegend ist hierbei die OSA-bedingte chronisch intermittierende Hypoxie. Dies konnte durch verschiedene Untersuchungen nachgewiesen werden, z.B. durch Messung zirkulierender Biomarker bei OSA-Patienten, durch Experimente im Ratten- bzw. Mausmodell der CIH und durch in-vitro-Untersuchungen an kultivierten Zellen unter intermittierender Hypoxie. Sympathikusaktivierung, oxidativer Stress und Inflammation sind hierbei die wichtigsten Pathomechanismen, welche sich klinisch sehr variabel manifestieren können. So

wird die OSA-bedingte arterielle Hypertonie vor allem auf die Sympathikusaktivierung zurückgeführt, während der oxidative Stress primär mit der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und die Inflammation mit der Entwicklung der Atherosklerose in Verbindung gebracht werden kann. Die verschiedenen Pathomechanismen können sich jedoch gegenseitig beeinflussen. Beispielsweise führen freie O₂-Radikale zu einem erhöhten Sympathikotonus und zu einer gesteigerten Transkription proinflammatorischer Mediatoren. Darüber hinaus wird die kardiovaskuläre Prädisposition von OSA-Patienten häufig durch zusätzlich vorliegende typische Risikofaktoren entscheidend beeinflusst, die durch die OSA selbst bedingt (Adipositas) oder durch sie verstärkt werden (arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Lipidstoffwechselstörungen).

Darüber hinaus trägt auch ein erhöhter intravaskulärer Stress zur Störung des vaskulären Mikromilieus bei OSA-Patienten bei. Es wurde beobachtet, dass isolierte Leukozyten von OSA-Patienten vermehrt freie O₂-Radikale freisetzen.¹⁰² Dies wiederum führt zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und einer erhöhten Lipidperoxidation. Erniedrigte Plasmaspiegel der NO-Metaboliten Nitrit und Nitrat sowie erhöhte Marker der Lipidperoxidation bei unbehandelten OSA-Patienten bestätigen diese Beobachtung.¹⁰³ Darüber hinaus wurden prokoagulatorische Veränderungen in Form einer erhöhten Thrombozytenaktivierung und -aggregation sowie erhöhter Fibrinogenspiegel beobachtet.^{104,105}

Durch die CIH werden außerdem die Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und NF- κ B aktiviert, wodurch die Expression von hypoxie-abhängigen Genprodukten gefördert wird. Dazu gehören beispielsweise Endothelin, Adrenomedullin oder der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF).^{106–108} Auch proinflammatorische Mediatoren wie lösliche Adhäsionsmoleküle und Zytokine wie TNF- α oder Interleukin-6 werden dadurch vermehrt exprimiert.^{109,110} Die Zytokine wiederum führen in der Leber zur Synthese von Akute-Phase-Proteinen, u.a. Fibrinogen, hochsensitivem C-reaktivem Protein (hsCRP) und Serum-Amyloid-A (SAA).^{111,112}

Die Störung des vaskulären Mikromilieus führt schließlich zu einer endothelialen Dysfunktion, die sich in einer eingeschränkten endothelabhängigen Vasoreaktivität manifestiert. Diese lässt sich bereits bei ansonsten gesunden OSA-Patienten nachweisen.¹¹³ Die Einschränkung der Vasoreaktivität ist dabei abhängig vom Schweregrad der OSA.¹¹³ Als Hauptursache der endothelialen Dysfunktion bei OSA-Patienten wird oxidativer Stress angesehen. Daneben spielt eine Störung der vaskulären Reparaturmechanismen mit einer Zunahme apoptotischer Endothelzellen und einer Abnahme endothelialer Progenitorzellen eine wichtige Rolle.^{114,115}

Pathophysiologisch lässt sich die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei OSA-Patienten somit durch das Zusammenspiel neuraler, mechanischer, hämodynamischer und humoraler Faktoren erklären. Im Vordergrund steht dabei die Störung des vaskulären Mikromilieus durch die intermittierende nächtliche Hypoxie. Ursächlich sind dabei vor allem die Sympathikusaktivierung, der erhöhte oxidative Stress und die proinflammatorischen Veränderungen.

5.2.2 Signalübertragungsweg von lncRNAs

Die in der vorliegenden Studie beobachtete Veränderung der *MRPL20-AS1*-Konzentration bei OSA-Patienten wirft die Frage auf, inwieweit dadurch das kardiovaskuläre Risiko der betroffenen Patienten beeinflusst wird. Denn eine Veränderung der lncRNA-Expression konnte mit vielen verschiedenen Pathophysiologien in Verbindung gebracht werden. So beeinflussen lncRNAs nicht nur das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung, sondern auch die Zellantwort auf Stress und Stimuli durch unterschiedliche Einflüsse auf die Genregulation.

Beispielsweise spielt *Mirt1* eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion nach einem Herzinfarkt.⁷² Die durch Hypoxie induzierte erhöhte Expression dieser lncRNA erleichterte den zellulären Transport des Transkriptionsfaktors NF- κ B und die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α . Dies wiederum führte zur Apoptose von Kardiomyozyten und zur Infiltration von Makrophagen in das Infarktgewebe. Vermutlich wird die Entzündungsreaktion aber noch durch viele weitere lncRNAs reguliert. Denn es konnte festgestellt werden, dass insgesamt 345 lncRNAs nach einem Herzinfarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe abweichend exprimiert wurden.⁷³

Da das OSAS durch CIH charakterisiert ist, wurden in einer Studie humane Endothelzellen *in vitro* CIH ausgesetzt und die Expression der lncRNA *MALAT1*, die eng mit der Endothelfunktion assoziiert ist, untersucht. Ihre Expression war unter intermittierender Hypoxie erhöht. Ein *MALAT1*-knockdown führte wiederum zu einer verstärkten Hypoxie-induzierten Schädigung humaner Endothelzellen.⁹⁵ Dies könnte darauf hindeuten, dass *MALAT1* infolge intermittierender Hypoxie vermehrt exprimiert wird, um eine Schädigung der Epithelzellen zu verhindern oder abzuschwächen. Um den molekularen Mechanismus besser zu verstehen, wurde ein Dual-Luciferase-Reporter-Assay durchgeführt. Dieser konnte bestätigen, dass *MALAT1* direkt mit miR-142-3p interagiert. Außerdem wurde der durch den *MALAT1*-Knockdown induzierte Schaden durch die Hemmung von miR-142-3p abgeschwächt. Das High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) interagiert direkt mit miR-142-3p und *MALAT1* reguliert HMGB1 über miR-142-3p. Die durch den *MALAT1*-Knockdown vermittelte

Hemmung der HMGB1-Expression konnte durch einen miR-142-3p-Inhibitor rückgängig gemacht werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *MALAT1* seine Wirkung in IH-behandelten HUVECs über die Regulierung von miR-142-3p/HMGB1 ausübt. Um den Signalübertragungsweg der in dieser Studie untersuchten lncRNA *MRPL20-AS1* näher zu untersuchen, könnte ein ähnlicher Versuch durchgeführt werden. Zunächst stellt sich die Frage, welchen Einfluss ein Knockdown auf die durch CIH vermittelte Schädigung von HCAECs hat. Darüber hinaus ließe ein Dual-Luciferase-Reporter-Assay Rückschlüsse auf die Interaktion mit anderen Faktoren zu, um die genaue Wirkung von *MRPL20-AS1* in Endothelzellen zu verstehen.

Auch in der Pathophysiologie der Atherosklerose deuten Studien darauf hin, dass lncRNAs eine Schlüsselrolle in der Regulation spielen könnten. So wurde festgestellt, dass die lncRNAs *ANRIL* und *MIAT* in atherosklerotischem Gewebe verstärkt exprimiert werden, während die Expression der lncRNA *MALAT1* reduziert ist.⁶⁵ *MALAT1* wurde in einem Experiment mit Mäusen weiter untersucht. CREMER et al. konnten feststellen, dass verminderte *MALAT1*-Konzentrationen in den Leukozyten des peripheren Blutes die Bildung atherosklerotischer Läsionen verstärkten.¹²¹ Ähnliche Ergebnisse ergaben sich aus einer Studie mit der lncRNA *H19*.¹¹⁶ Die Autoren konnten feststellen, dass deren Serumkonzentration bei Patienten mit Atherosklerose im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht war. Nach Überexpression von *H19* in HUVECs und Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells; VSMCs) wurde eine erhöhte Proliferationsfähigkeit und eine verminderte Apoptose beobachtet. Die Autoren schlossen daraus, dass *H19* durch die Regulation der Proliferation und Apoptose von HUVECs und VSMCs in der Lage sein könnte, die Atherosklerose zu fördern. Darüber hinaus wurde der genaue molekulare Mechanismus untersucht. Die MAPK- und NF- κ B-Signalwege spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Funktion von HUVECs und VSMCs. Dies führt zu der Annahme, dass beide Signalwege Schlüsselfaktoren bei der Entstehung von Atherosklerose darstellen.¹¹⁷ Die Überexpression von *H19* führte zu erhöhten Spiegeln der Mediatoren p38 und p65. Diese sind die Schlüsselfaktoren der genannten Signalwege. PAN schloss daraus, dass *H19* die MAPK- und NF- κ B-Signalwege in HUVECs und VSMCs aktiviert. Eventuell greift *MRPL20-AS1* in ähnlicher Weise wie *H19* in diese Signalwege ein. Um dies genauer zu untersuchen, könnte in einem Versuch eine Überexpression von *MRPL20-AS1* in HUVECs und VSMCs durchgeführt werden mit anschließender Messung der p38- und p65-Werte. Falls diese lncRNA ähnliche Effekte wie *H19* erzielt, müssten die Werte ebenfalls erhöht sein. Dadurch ließen sich Rückschlüsse auf den Signalübertragungsweg von *MRPL20-AS1* ziehen.

Da Atherosklerose die pathologische Ursache der meisten kardiovaskulären Krankheiten darstellt, lassen die Ergebnisse der oben genannten Studien den Schluss zu, dass lncRNAs wahrscheinlich einen wichtigen Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko haben. Ihre Rolle und ihre molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig geklärt und bedürfen weiterer Forschung.

Es konnte bereits festgestellt werden, dass OSA durch die Freisetzung von Exosomen die Zellalterung auslösen und verstärken kann. Dies geschieht vermutlich über Signalwege, die mit oxidativem Stress in Verbindung stehen.¹¹⁸ Exosomen sind kleine extrazelluläre Vesikel, die durch Exozytose aus der Zelle freigesetzt werden können und an der interzellulären Kommunikation beteiligt sind. Sie enthalten eine Vielzahl von Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden und kommen in fast allen Körperflüssigkeiten vor.¹¹⁹ Exosomale lncRNAs weisen in verschiedenen Zellen oder unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen unterschiedliche Expressionsmuster auf. Sie stehen im Fokus der Forschung, da sie biologische Funktionen ausüben und als Biomarker für verschiedene Krankheiten dienen könnten. Beispielsweise könnte die exosomale lncRNA *SOX2-OT*, die im Plasma zirkuliert, als Biomarker für Plattenepithelkarzinome der Lunge dienen.¹²⁰ Die lncRNA *SLC2A12-10:1* wurde als potenzieller Biomarker für Magenkrebs untersucht.¹²¹

Die Expression von lncRNAs in Plasmaexosomen bei OSA-Patienten wurde von CHEN et al. untersucht.¹²² Dies ist für die vorliegende Studie von Interesse, da Vergleiche zwischen den Ergebnissen zu lncRNAs in Plasmaexosomen und frei im Plasma zirkulierenden lncRNAs gezogen werden können. Darüber hinaus ist von Interesse, wie die Autoren die Ergebnisse bewerten und welche Schlussfolgerungen sie in Bezug auf die Verwendung als Biomarker für die Diagnose von OSA und den Nutzen in der Therapie ziehen. An der Studie nahmen insgesamt 63 Probanden teil, von denen 25 zur Kontrollgruppe gehörten und 38 OSA-Patienten waren. Bei den OSA-Patienten wurde zwischen Patienten mit (23) und ohne (15) Hypertension unterschieden. Es zeigte sich, dass in allen drei Gruppen die lncRNAs in den Plasmaexosomen unterschiedlich exprimiert wurden. Die Autoren deuteten an, dass ein Screening dieser lncRNAs Biomarker für die Diagnose von OSA liefern könnte. Darüber hinaus identifizierten sie drei Signalwege, von denen sie annahmen, dass sie eine Schlüsselrolle bei der Regulation des OSA-Prozesses spielen: Zum einen TGF- β , da dieses multifunktionelle Peptid an der Pathogenese der OSA beteiligt sein könnte.^{123,124} Der Grund hierfür könnte sein, dass durch chronische Entzündung und Hypoxie viele Entzündungsmediatoren in der subkutanen Schicht abgelagert werden, die über eine Reihe von Signalen die Synthese und Freisetzung von TGF- β im Serum von OSA-Patienten induzieren. Zum anderen wurde Glutamat mit der Pathogenese

der OSA in Verbindung gebracht, da dieser Neurotransmitter auch an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Schlaf und Wachsein beteiligt ist.^{125,126} Darüber hinaus reguliert Glutamat die Muskelspannung während des Schlafs. Studien haben gezeigt, dass Neurotransmitter auch eine Schlüsselrolle im Schlaf-Wach-System von OSA-Patienten spielen.^{127,128} Der dritte Signalweg, der von den Autoren herausgestellt wurde, betrifft ErbB, das eine schützende Wirkung auf Neuronen im Gehirn ausübt.¹²⁹ Es wird vermutet, dass Nrdp1 durch die Regulierung von ErbB die mit OSA verbundenen kognitiven Defizite beeinflussen könnte.¹³⁰ Die Autoren spekulierten daher, dass der TGF- β -, der glutamaterge Synapsen- und der ErbB-Signalweg eine Schlüsselrolle bei der Regulation des OSA-Pathomechanismus spielen könnten. Die genauen Mechanismen dieser drei Signalwege im Zusammenhang mit OSA sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht und bedürfen weiterer Untersuchungen. Die Studie zeigte, dass die funktionellen Annotationen der unterschiedlich exprimierten mRNAs und der cis-Zielgene der unterschiedlich exprimierten lncRNAs im Wesentlichen übereinstimmen. Dies deutet darauf hin, dass lncRNAs als regulatorische Faktoren eine Rolle bei der Entstehung und der Entwicklung von OSA spielen.¹²² Darüber hinaus untersuchten die Autoren auch die Korrelation zwischen dem Schweregrad von OSA und der Expression der lncRNA *ENST00000592016*. Denn der Zusammenhang zwischen OSA und endothelialer Dysfunktion kann vom Schweregrad der OSA abhängen. Sie stellten fest, dass die Expression der untersuchten lncRNA mit dem Schweregrad korreliert. Außerdem eignete sich diese lncRNA zur Identifizierung von moderater und schwerer OSA. Inwieweit hier ein Zusammenhang mit der endothelialen Dysfunktion besteht, die durch CIH hervorgerufen werden kann, während eine leichte OSA keine Endothelschädigung verursacht, sollte nach Ansicht der Autoren weiter untersucht werden.

Die Ergebnisse stehen teilweise im Einklang zu denen der vorliegenden Studie. *MRPL20AS1* ist ebenfalls mit dem Schweregrad der OSA assoziiert. Allerdings wird diese lncRNA, die frei im Plasma zirkuliert, nicht vermehrt, sondern vermindert exprimiert. Dies muss nicht unbedingt im Widerspruch zu den Ergebnissen von CHEN et al. stehen. Die Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die Expression von endothelassoziierten lncRNAs durch CIH sowohl hoch-, als auch herunterreguliert werden kann, je nachdem, welche Gene durch die jeweilige lncRNA reguliert werden bzw. welche Effekte sie im Organismus ausübt. Eine andere Überlegung wäre, dass *MRPL20-AS1* als Reaktion auf die nächtliche Hypoxie herunterreguliert wird, um möglicherweise entstandene Schäden und damit das kardiovaskuläre Risiko zu reduzieren. Die verminderte Konzentration am Morgen könnte dann als physiologische, gegenregulatorische Reaktion auf die OSA-Symptomatik interpretiert werden. Aufgrund der geringen

Probandenzahl sollten die Ergebnisse jedoch verifiziert werden, um verlässlichere Schlussfolgerungen ziehen zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass verschiedene Ansätze darauf hindeuten, dass die Veränderung der *MRPL20-AS*-Konzentration einen Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko von OSA-Patienten hat. Um den genauen Mechanismus zu verstehen, sind weitere Studien mit einer größeren Anzahl an Probanden erforderlich.

5.3 *MRPL20-AS1* im Zellmodell

Die in dieser Studie untersuchte lncRNA *MRPL20-AS1* ist bisher noch nicht erforscht worden. Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurde daher ein Zellexperiment durchgeführt, bei dem Endothelzellen einer Hypoxie ausgesetzt wurden. Die Grundlage dieses Experiments ist die Beobachtung, dass Hypoxie der grundlegende Pathomechanismus hinter der OSA in Bezug auf die Endothelzellschädigung ist. Wie bereits herausgestellt wurde, stellen die Endothelzellen das Bindeglied zwischen OSA und Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar, da ihre Funktion durch die OSA stark beeinträchtigt wird und ihre Dysfunktion zu Atherosklerose führt.⁴⁶

Die Expression von *MRPL20-AS1* war im Zellversuch unter Hypoxie signifikant reduziert. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den Blutproben von OSA-Patienten überein, in denen die Konzentration der frei zirkulierenden lncRNA *MRPL20-AS1* ebenfalls reduziert war. Bisher konnten weitere lncRNAs identifiziert werden, die in Endothelzellen durch Hypoxie reguliert werden. MOREAU et al. identifizierten in ihrem Zellmodell mit humanen Endothelzellen unter Hypoxie insgesamt 1763 dysregulierte lncRNAs.¹³¹ Davon waren 544 hoch- und 350 herunterreguliert. Unter anderem waren *HYMAI*, *LOC730101*, *KIAA1656* und *LOC339803* in den Endothelzellen durch Hypoxie hochreguliert und auch in atherosklerotischen Plaques überexprimiert. *MALAT1* wurde in der Studie in atherosklerotischen Plaques herunterreguliert. Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien berichtet, dass *MALAT1* nach 24 h anhaltender Hypoxie hochreguliert war.^{93,95} MOREAU et al. wählten im Gegensatz zu den anderen Studien einen Zeitraum von acht Stunden, in dem sie die Endothelzellen der Hypoxie aussetzten, um frühe und späte Reaktionen auf die Hypoxie untersuchen zu können. Die Autoren argumentieren, dass die Richtung der Dysregulation vom Kontext der jeweiligen Erkrankung abhängt und dass neben der Hypoxie auch andere Faktoren zu einer veränderten Expression beitragen können. Außerdem sei die Expression auch gewebe- und zellspezifisch. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass eine kurze Hypoxie-Exposition das Überleben und Wachstum der Zellen fördert, während eine längere Exposition zum Zelltod führt.¹³² Dies

könnte erklären, warum *MALAT1* in einigen Studien bei kurzer Hypoxie-Exposition herunterreguliert und in anderen Studien bei längerer Exposition hochreguliert wurde.

Bei den Untersuchungen im Zellmodell wird jedoch eine prolongierte Hypoxie genutzt, was nur bedingt Rückschlüsse auf die Situation *in vivo* zulässt. Denn charakteristisch für das OSAS ist die intermittierende Hypoxie. Daher ist die Vergleichbarkeit dieser Studie mit anderen Studien, die den Einfluss von prolongierter Hypoxie auf Konzentrationsänderungen untersuchen, nur eingeschränkt gegeben. Dennoch konnte in der vorliegenden Studie sowohl im Zellmodell als auch in den Blutproben eine herunterregulierte Expression der lncRNA *MRPL20-AS1* nachgewiesen werden. Daraus könnte geschlossen werden, dass weniger die Art der Hypoxie als vielmehr die Schädigung der Endothelzellen, die sowohl in intermittierenden als auch in anhaltenden Hypoxiephasen auftritt, einen Einfluss auf die Tendenz der veränderten Expression hat.

5.4 *MRPL20-AS1* als Biomarker

Die übliche Diagnostik des OSAS erfolgt durch eine polysomnographische Schlafuntersuchung, die sowohl technisch als auch zeitlich aufwändig ist. Daher wird seit einiger Zeit nach Alternativen gesucht, um die Diagnostik einfacher und für die Patienten zugänglicher zu machen. In früheren Studien wurden vor allem Biomarker für Entzündung, oxidativen Stress und Glykolipidstoffwechsel als Biomarker für OSA untersucht, die Ergebnisse waren jedoch widersprüchlich, und Sensitivität und Spezifität schienen unzureichend zu sein.¹²² Aufgrund des schleichenden Charakters und der Heterogenität von OSA ist es von entscheidender Bedeutung, einen molekularen Marker zu finden, der die Merkmale des frühen Auftretens von OSA widerspiegelt. Die Suche nach molekularen Markern, die eine korrekte Identifizierung der OSA ermöglichen, und das Verständnis der Pathogenese der OSA sind daher von entscheidender Bedeutung für die frühzeitige Einleitung geeigneter therapeutischer Maßnahmen und die Identifizierung neuer therapeutischer Ansatzpunkte.

Die Langzeitstabilität, die Nachweisbarkeit in extrazellulären Flüssigkeiten und die Tatsache, dass lncRNAs ein krankheitsspezifisches Häufigkeitsmuster aufweisen, machen sie für die nicht-invasive Prognostik und Diagnostik sehr interessant. Diesbezüglich wurden sie zunächst vor allem im Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen untersucht. Es gibt aber auch einige Studien, die lncRNAs als Biomarker bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen untersuchen. Renommiert ist in diesem Zusammenhang die Studie von

KUMARSWAMY et al. Die Autoren stellten fest, dass Plasmakonzentrationen der lncRNA *LIPCAR* mit einem linksventrikulären Remodeling nach Myokardinfarkt und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz assoziiert waren.⁷⁹ Darüber hinaus war bei erhöhten *LIPCAR*-Konzentrationen im Plasma auch das Risiko eines Herzversagens bei chronischer Herzinsuffizienz erhöht. In einer 2-Jahres-Follow-up-Studie konnte zudem gezeigt werden, dass *LIPCAR* auch ein unabhängiger Risikofaktor für diastolische Dysfunktion bei Typ-2-Diabetikern ist. In derselben Studie wurden auch die lncRNAs *MIAT* und *SENCR* mit dem linksventrikulären Remodeling in Verbindung gebracht. Andere Studien identifizierten die lncRNAs *NRON* und *MHRT* als weitere unabhängige Prädiktoren für Herzinsuffizienz und erhöhte Plasmawerte von *ANRIL* wurden mit einem erhöhten Risiko für Restenose in Verbindung gebracht.^{81,82}

Eine für diese Studie sehr interessante Untersuchung, auf die bereits Bezug genommen wurde, ist die Studie von CHEN et al.¹²² Denn sie konnten feststellen, dass die lncRNA *ENST00000592016* eine Unterscheidung zwischen OSA-Patienten und Gesunden ermöglichte. Darüber hinaus war auch der Schweregrad der OSA mit einer Veränderung der lncRNA-Expression assoziiert. *ENST00000592016* korrelierte auch mit den klinischen Merkmalen BMI, AHI und ODI. Die Autoren schlossen daraus, dass diese lncRNA als potentiell molekulares Ziel für die Diagnose und Risikostratifizierung dienen könnte. Diese Überlegung lässt sich in der vorliegenden Studie auch auf *MRPL20ASI* übertragen, da diese lncRNA ebenfalls mit dem Schweregrad der OSA korreliert. Ob damit eine Differenzierung zwischen Gesunden und OSA-Patienten möglich ist, lässt sich aus den Ergebnissen dieser Studie jedoch nicht ableiten. Dazu müsste die Expression von *MRPL20-ASI* bei Gesunden untersucht werden, um die Werte vergleichen zu können.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Stuck BA, Arzt M, Fietze I, *et al.* Teil-Aktualisierung S3-Leitlinie Schlafbezogene Atmungsstörungen bei Erwachsenen. In: *Somnologie* 24. 2020: 176–208.
- 2 Salman LA, Shulman R, Cohen JB. Obstructive Sleep Apnea, Hypertension, and Cardiovascular Risk: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Curr Cardiol Rep* 2020; **22**: 6.
- 3 Statello L, Guo CJ, Chen LL, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021; **22**: 96–118.
- 4 Thorpy M. International Classification of Sleep Disorders. In: *Sleep Disorders Medicine*. Springer, New York, NY. 2017: 475–84.
- 5 Sateia MJ. International Classification of Sleep Disorders -Third Edition. *Am Coll Chest Physicians* 2014; **146**: 1387–94.
- 6 Ho ML, Brass SD. Obstructive sleep apnea. *Neurol Int* 2011; **3**: 15.
- 7 Punjabi NM. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 2008; **5**: 136–43.
- 8 Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The Occurrence of Sleep-Disordered Breathing among Middle-Aged Adults. *N Engl J Med* 1993; **328**: 1230–5.
- 9 Peppard PE, Young T, Barnett JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM. Increased Prevalence of Sleep-Disordered Breathing in Adults. *Am J Epidemiol* 2013; **177**: 1006–14.
- 10 Schwab RJ, Pasirstein M, Pierson R, *et al.* Identification of upper airway anatomic risk factors for obstructive sleep apnea with volumetric magnetic resonance imaging. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; **168**: 522–30.
- 11 Patil SP, Schneider H, Marx JJ, Gladmon E, Schwartz AR, Smith PL. Neuromechanical control of upper airway patency during sleep. *J Appl Physiol* 2007; **102**: 547–56.
- 12 Jordan AS, Whit DP, Lo YL, *et al.* Airway dilator muscle activity and lung volume during stable breathing in obstructive sleep apnea. *Sleep* 2009; **32**: 361–8.
- 13 Eckert DJ, Malhotra A, Wellman A, White DP. Trazodone increases the respiratory arousal threshold in patients with obstructive sleep apnea and a low arousal threshold. *Sleep* 2014; **37**: 811–9.
- 14 Eckert DJ, Younes MK. Arousal from sleep: implications for obstructive sleep apnea pathogenesis and treatment. *J Appl Physiol* 2014; **116**: 302–13.
- 15 Wellman A, Jordan AS, Malhotra A, *et al.* Ventilatory control and airway anatomy in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; **170**: 1225–32.
- 16 Eckert DJ. Phenotypic approaches to obstructive sleep apnoea – New pathways for targeted therapy. *Sleep Med Rev* 2018; **37**: 45–59.
- 17 Lee W, Nagubadi S, Kryger M, Mokhlesi B. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population-based perspective. 2008; : 349–64.
- 18 Lawati NM Al, Patel SR, Ayas NT. Consequences of Obstructive Sleep Apnea and Short Sleep Duration. *Prog Cardiovasc Dis* 2009; **51**: 285–93.
- 19 Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. State of the Art Epidemiology of Obstructive Sleep Apnea A Population Health Perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **165**: 1217–39.
- 20 Malhotra A, White DP. Obstructive sleep apnoea. *Lancet* 2002; **360**: 237–45.

- 21 Mukherjee S, Saxena R, Palmer LJ, *et al.* HHS Public Access. *Respirology* 2020; **23**: 18–27.
- 22 Carmelli D, Colrain IM, Swan GE, Bliwise DL. Genetic and Environmental Influences in Sleep-Disordered Breathing in Older Male Twins. *Sleep* 2004; **27**: 917–22.
- 23 Veasey SC, Rosen IM. Obstructive Sleep Apnea in Adults. *N Engl J Med* 2019; **380**: 1442–9.
- 24 Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: The Epworth sleepiness scale. *Sleep* 1991; **14**: 540–5.
- 25 Epstein LJ, Kristo D, Strollo PJ, *et al.* Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *J. Clin. Sleep Med.* 2009; **5**: 263–76.
- 26 Semelka M, Wilson J, Floyd R. Diagnosis and Treatment of Obstructive Sleep Apnea in Adults. *Am Fam Physician* 2016; **94**: 355–60.
- 27 Antic NA, Catcheside P, Buchan C, *et al.* The effect of CPAP in normalizing daytime sleepiness, quality of life, and neurocognitive function in patients with moderate to severe OSA. *Sleep* 2011; **34**: 111–9.
- 28 Faccenda JF, Mackay TW, Boon NA, Douglas NJ. Randomized placebo-controlled trial of continuous positive airway pressure on blood pressure in the sleep apnea-hypopnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **163**: 344–8.
- 29 Martínez-García MÁ, Capote F, Campos-Rodríguez F, *et al.* Effect of CPAP on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea and resistant hypertension: The HIPARCO randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc* 2013; **310**: 2407–15.
- 30 Myhill PC, Davis WA, Peters KE, Chubb SAP, Hillman D, Davis TME. Effect of continuous positive airway pressure therapy on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes and obstructive sleep apnea. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; **97**: 4212–8.
- 31 Kushida CA, Morgenthaler TI, Littner MR, *et al.* Practice parameters for the treatment of snoring and obstructive sleep apnea with oral appliances: An update for 2005. *Sleep* 2006; **29**: 240–3.
- 32 Ferguson KA, Ono T, Lowe AA, Al-Majed S, Love LL, Fleetham JA. A short term controlled trial of ant adjustable oral appliance for the treatment of mild to moderate obstructive sleep apnoea. *Thorax* 1997; **52**: 362–8.
- 33 Bratton DJ, Gaisl T, Wons AM, Kohler M. CPAP vs Mandibular Advancement Devices and Blood Pressure in Patients With Obstructive Sleep Apnea. *JAMA* 2015; **314**: 2280.
- 34 Ramar K, Dort LC, Katz SG, *et al.* Clinical practice guideline for the treatment of obstructive sleep apnea and snoring with oral appliance therapy: An update for 2015. *J Clin Sleep Med* 2015; **11**: 773–828.
- 35 Sommer JU, Heiser C, Gahleitner C, *et al.* Tonsillectomy with Uvulopalatopharyngoplasty in Obstructive Sleep Apnea. *Dtsch Arztebl Int* 2016; **113**: 1–8.
- 36 Heiser C, Steffen A, Boon M, *et al.* Post-approval upper airway stimulation predictors of treatment effectiveness in the ADHERE registry. *Eur Respir J* 2019; **53**: 1801405.
- 37 Hou H, Zhao Y, Yu W, *et al.* Association of obstructive sleep apnea with hypertension: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Health* 2018; **8**. DOI:10.7189/jogh.08.010405.
- 38 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.
- 39 Zhao E, Chen S, Du Y, Zhang Y. Association between Sleep Apnea Hypopnea Syndrome and the Risk of Atrial Fibrillation: A Meta-Analysis of Cohort Study. *Biomed Res Int* 2018; **2018**: 1–8.
- 40 Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, *et al.* Prospective study of obstructive sleep apnea and incident

- coronary heart disease and heart failure: The sleep heart health study. *Circulation* 2010; **122**: 352–60.
- 41 Young T, Peppard P, Palta M, *et al.* Population-Based Study of Sleep-Disordered Breathing as a Risk Factor for Hypertension. *Arch Intern Med* 1997; **157**: 1746–52.
- 42 Minoguchi K, Yokoe T, Tazaki T, *et al.* Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **172**: 625–30.
- 43 Foster GE, Brugniaux J V., Pialoux V, *et al.* Cardiovascular and cerebrovascular responses to acute hypoxia following exposure to intermittent hypoxia in healthy humans. *J Physiol* 2009; **587**: 3287–99.
- 44 Somers VK, Dyken ME, Clary MP, Abboud FM. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 1995; **96**: 1897–904.
- 45 Phillips CL, O’driscoll DM. Hypertension and obstructive sleep apnea. *Nat. Sci. Sleep*. 2013; **5**: 43–52.
- 46 Kohler M, Stradling JR. Mechanisms of vascular damage in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol* 2010; **7**: 677–85.
- 47 Wojciechowska A, Braniewska A, Kozar-Kamińska K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2017; **26**: 865–74.
- 48 Uszczyńska-Ratajczak, B., Lagarde, J., Frankish, A., Guigo, R. & Johnson R. Towards a complete map of the human long non-coding RNA transcriptome. *Nat Rev Genet* 2019; **19**: 535–48.
- 49 Fang S, Zhang L, Guo J, *et al.* NONCODEV5: a comprehensive annotation database for long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res* 2018; **46**: D308–14.
- 50 Sun Q, Hao Q PK. Nuclear long noncoding RNAs: key regulators of gene expression. *Trends Genet* 2019; **34**: 142–57.
- 51 Noh JH, Kim KM, Mcclusky W, Abdelmohsen K. Cytoplasmic functions of lncRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2018; **9**: 1–24.
- 52 Hezroni H, Perry RBT, Ulitsky I. Long Noncoding RNAs in Development and Regeneration of the Neural Lineage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2019; **84**: 165–77.
- 53 Sun L, Lin JD. Function and Mechanism of Long Noncoding RNAs in Adipocyte Biology. *Diabetes* 2019; **68**: 887–96.
- 54 Chen YG, Satpathy AT, Chang HY. Gene regulation in the immune system by long noncoding RNAs. *Nat Immunol* 2017; **18**: 962–72.
- 55 Hobuß L, Bär C, Thum T. Long Non-coding RNAs: At the Heart of Cardiac Dysfunction? *Front Physiol* 2019; **10**: 1–9.
- 56 Sweta S, Dudnakova T, Sudheer S, Baker AH, Bhushan R. Importance of Long Non-coding RNAs in the Development and Disease of Skeletal Muscle and Cardiovascular Lineages. *Front Cell Dev Biol* 2019; **7**: 1–19.
- 57 Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet* 2014; **15**: 7–21.
- 58 Cremer S, Michalik KM, Fischer A, *et al.* Hematopoietic Deficiency of the Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Atherosclerosis and Plaque Inflammation. *Circulation* 2019; **139**: 1320–34.
- 59 Viereck J, Kumarswamy R, Foinquinos A, *et al.* Long noncoding RNA Chast promotes cardiac remodeling. *Sci Transl Med* 2016; **8**: 1–13.
- 60 Wang Z, Zhang X-J, Ji Y-X, *et al.* The long noncoding RNA Chaer defines an epigenetic checkpoint in cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2016; **22**: 1131–9.

- 61 Qu X, Du Y, Shu Y, *et al.* MIAT Is a Pro-fibrotic Long Non-coding RNA Governing Cardiac Fibrosis in Post-infarct Myocardium. *Sci Rep* 2017; **7**: 42657.
- 62 Li Y, Wang J, Sun L, Zhu S. LncRNA myocardial infarction-associated transcript (MIAT) contributed to cardiac hypertrophy by regulating TLR4 via miR-93. *Eur J Pharmacol* 2018; **818**: 508–17.
- 63 Grote P, Wittler L, Hendrix D, *et al.* The Tissue-Specific lncRNA Fendrr Is an Essential Regulator of Heart and Body Wall Development in the Mouse. *Dev Cell* 2013; **24**: 206–14.
- 64 Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, *et al.* Braveheart, a Long Noncoding RNA Required for Cardiovascular Lineage Commitment. *Cell* 2013; **152**: 570–83.
- 65 Arslan S, Berkan Ö, Lalem T, *et al.* Long non-coding RNAs in the atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 2017; **266**: 176–81.
- 66 Han P, Li W, Lin C-H, *et al.* A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature* 2014; **514**: 102–6.
- 67 Ishii N, Ozaki K, Sato H, *et al.* Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *J Hum Genet* 2006; **51**: 1087–99.
- 68 Zhu X-H, Yuan Y-X, Rao S-L, Wang P. LncRNA MIAT enhances cardiac hypertrophy partly through sponging miR-150. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; **20**: 3653–60.
- 69 Wang K, Long B, Zhou L-Y, *et al.* CARL lncRNA inhibits anoxia-induced mitochondrial fission and apoptosis in cardiomyocytes by impairing miR-539-dependent PHB2 downregulation. *Nat Commun* 2014; **5**: 3596.
- 70 Wang K, Sun T, Li N, *et al.* MDRL lncRNA Regulates the Processing of miR-484 Primary Transcript by Targeting miR-361. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004467.
- 71 Long B, Li N, Xu X-X, *et al.* Long noncoding RNA FTX regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting miR-29b-1-5p and Bcl2l2. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; **495**: 312–8.
- 72 Li X, Zhou J, Huang K. Inhibition of the lncRNA Mirt1 Attenuates Acute Myocardial Infarction by Suppressing NF-κB Activation. *Cell Physiol Biochem* 2017; **42**: 1153–64.
- 73 Wang X, Li Z, Du Y, *et al.* lncRNA Mirt1: A Critical Regulatory Factor in Chronic Intermittent Hypoxia Exaggerated Post-MI Cardiac Remodeling. *Front Genet* 2022; **13**: 1–14.
- 74 Martignano F, Rossi L, Maugeri A, *et al.* Urinary RNA-based biomarkers for prostate cancer detection. *Clin Chim Acta* 2017; **473**: 96–105.
- 75 Zhou X, Yin C, Dang Y, Ye F, Zhang G. Identification of the long non-coding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer. *Sci Rep* 2015; **5**: 11516.
- 76 Terracciano D, Ferro M, Terreri S, *et al.* Urinary long noncoding RNAs in nonmuscle-invasive bladder cancer: new architects in cancer prognostic biomarkers. *Transl Res* 2017; **184**: 108–17.
- 77 Li Q, Shao Y, Zhang X, *et al.* Plasma long noncoding RNA protected by exosomes as a potential stable biomarker for gastric cancer. *Tumor Biol* 2015; **36**: 2007–12.
- 78 Viereck J, Thum T. Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury. *Circ Res* 2017; **120**: 381–99.
- 79 Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, *et al.* Circulating Long Noncoding RNA, LIPCAR, Predicts Survival in Patients With Heart Failure. *Circ Res* 2014; **114**: 1569–75.
- 80 Zhang Z, Gao W, Long Q-Q, *et al.* Increased plasma levels of lncRNA H19 and LIPCAR are associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Sci Rep* 2017; **7**: 7491.

- 81 Xuan L, Sun L, Zhang Y, *et al.* Circulating long non-coding RNAs NRON and MHRT as novel predictive biomarkers of heart failure. *J Cell Mol Med* 2017; **21**: 1803–14.
- 82 Wang F, Su X, Liu C, Wu M, Li B. Prognostic Value of Plasma Long Noncoding RNA ANRIL for In-Stent Restenosis. *Med Sci Monit* 2017; **23**: 4733–9.
- 83 Gutschner T, Richtig G, Haemmerle M, Pichler M. From biomarkers to therapeutic targets—the promises and perils of long non-coding RNAs in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2018; **37**: 83–105.
- 84 Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Sahenk Z, *et al.* Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2013; **74**: 637–47.
- 85 Santos RD, Raal FJ, Catapano AL, Witztum JL, Steinhagen-Thiessen E, Tsimikas S. Mipomersen, an Antisense Oligonucleotide to Apolipoprotein B-100, Reduces Lipoprotein(a) in Various Populations With Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; **35**: 689–99.
- 86 Geary RS, Baker BF, Crooke ST. Clinical and Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Mipomersen (Kynamro®): A Second-Generation Antisense Oligonucleotide Inhibitor of Apolipoprotein B. *Clin Pharmacokinet* 2015; **54**: 133–46.
- 87 Rader DJ, Kastelein JJP. Lomitapide and Mipomersen. *Circulation* 2014; **129**: 1022–32.
- 88 Lennox KA, Behlke MA. Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2016; **44**: 863–77.
- 89 Swayze EE, Siwkowski AM, Wancewicz E V., *et al.* Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: 687–700.
- 90 Micheletti R, Plaisance I, Abraham BJ, *et al.* The long noncoding RNA Wisper controls cardiac fibrosis and remodeling. *Sci Transl Med* 2017; **9**: 139–48.
- 91 Piccoli M-T, Gupta SK, Viereck J, *et al.* Inhibition of the Cardiac Fibroblast–Enriched lncRNA Meg3 Prevents Cardiac Fibrosis and Diastolic Dysfunction. *Circ Res* 2017; **121**: 575–83.
- 92 Burdick AD, Sciabola S, Mantena SR, *et al.* Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid—modified antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**: 4882–91.
- 93 Michalik KM, You X, Manavski Y, *et al.* Long Noncoding RNA MALAT1 Regulates Endothelial Cell Function and Vessel Growth. *Circ Res* 2014; **114**: 1389–97.
- 94 Liu J-Y, Yao J, Li X-M, *et al.* Pathogenic role of lncRNA-MALAT1 in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1506–e1506.
- 95 Chen M-X, Chen L-D, Huang J-C, Zeng A-M, Huang J-F, Lin Q-C. Long non-coding RNA MALAT1 affects intermittent hypoxia-induced endothelial injury by regulating miR-142-3p/HMGB1. *Sleep Breath* 2022; **26**: 2015–24.
- 96 Chen Q, Lin G, Huang J, Chen G, Huang X, Lin Q. Expression profile of long non-coding RNAs in rat models of OSA-induced cardiovascular disease: new insight into pathogenesis. *Sleep Breath* 2019; **23**: 795–804.
- 97 Zietzer A, Steffen E, Niepmann S, *et al.* MicroRNA-mediated vascular intercellular communication is altered in chronic kidney disease. *Cardiovasc Res* 2022; **118**: 316–33.
- 98 Zietzer A, Breittrück N, Düsing P, *et al.* The lncRNA MRPL20-AS1 is associated with severe OSAS and downregulated upon hypoxic injury of endothelial cells. *Int J Cardiol* 2022; **369**: 65–8.
- 99 Uchida S, Dimmeler S. Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Diseases. *Circ Res* 2015; **116**: 737–50.

- 100 Punjabi NM. Sleep-Disordered Breathing, Glucose Intolerance, and Insulin Resistance: The Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol* 2004; **160**: 521–30.
- 101 Schulz R. The vascular micromilieu in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2005; **25**: 780–2.
- 102 Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K, *et al.* Enhanced Release of Superoxide from Polymorphonuclear Neutrophils in Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **162**: 566–70.
- 103 Schulz R, Schmidt D, Blum A, *et al.* Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy. *Thorax* 2000; **55**: 1046–51.
- 104 Chin K, Ohi M, Kita H, *et al.* Effects of NCPAP therapy on fibrinogen levels in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **153**: 1972–6.
- 105 Bokinsky G, Miller M, Ault K, Husband P, Mitchell J. Spontaneous Platelet Activation and Aggregation During Obstructive Sleep Apnea and Its Response to Therapy With Nasal Continuous Positive Airway Pressure. *Chest* 1995; **108**: 625–30.
- 106 Schulz R, Hummel C, Heinemann S, Seeger W, Grimminger F. Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **165**: 67–70.
- 107 Phillips BG, Narkiewicz K, Pesek CA, Haynes WG, Dyken ME, Somers VK. Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure. *J Hypertens* 1999; **17**: 61–6.
- 108 Schulz R, Flötotto C, Jahn A, *et al.* Circulating adrenomedullin in obstructive sleep apnoea. *J Sleep Res* 2006; **15**: 89–95.
- 109 Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of Plasma Cytokines in Disorders of Excessive Daytime Sleepiness: Role of Sleep Disturbance and Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 1313–6.
- 110 Chin K, Nakamura T, Shimizu K, *et al.* Effects of nasal continuous positive airway pressure on soluble cell adhesion molecules in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Med* 2000; **109**: 562–7.
- 111 Shamsuzzaman ASM, Winnicki M, Lanfranchi P, *et al.* Elevated C-Reactive Protein in Patients With Obstructive Sleep Apnea. *Circulation* 2002; **105**: 2462–4.
- 112 Svatikova A, Wolk R, Shamsuzzaman AS, Kara T, Olson EJ, Somers VK. Serum Amyloid A in Obstructive Sleep Apnea. *Circulation* 2003; **108**: 1451–4.
- 113 Carlson JT, Røngemark C, Hedner JA. Attenuated endothelium-dependent vascular relaxation in patients with sleep apnoea. *J Hypertens* 1996; **14**: 577–84.
- 114 Solh AA El, Akinnusi ME, Baddoura FH, Mankowski CR. Endothelial Cell Apoptosis in Obstructive Sleep Apnea A Link to Endothelial Dysfunction. 2007; **175**: 1186–91.
- 115 Manuscript A, Stress O. NIH Public Access. 2010; **117**: 2270–8.
- 116 Pan J-X. LncRNA H19 promotes atherosclerosis by regulating MAPK and NF-κB signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; **21**: 322–8.
- 117 Yu Q, Zeng K, Ma X, *et al.* Resokaempferol-mediated anti-inflammatory effects on activated macrophages via the inhibition of JAK2/STAT3, NF-κB and JNK/p38 MAPK signaling pathways. *Int Immunopharmacol* 2016; **38**: 104–14.
- 118 Khalyfa A, Marin JM, Qiao Z, Rubio DS, Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Plasma exosomes in OSA patients promote endothelial senescence: effect of long-term adherent continuous positive airway pressure. *Sleep* 2020; **43**: 1–12.

- 119 Kalluri R, LeBleu VS. The biology , function , and biomedical applications of exosomes. *Science* (80-) 2020; **367**. DOI:10.1126/science.aau6977.
- 120 Teng Y, Kang H, Chu Y. Identification of an Exosomal Long Noncoding RNA SOX2-OT in Plasma as a Promising Biomarker for Lung Squamous Cell Carcinoma. *Genet Test Mol Biomarkers* 2019; **23**: 235–40.
- 121 Zhou H, Shen W, Zou H, Lv Q, Shao P. Circulating exosomal long non-coding RNA H19 as a potential novel diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *J Int Med Res* 2020; **48**: 030006052093429.
- 122 Chen X, Liu H, Huang R, Wei R, Zhao Y, Li T. Screening of plasma exosomal lncRNAs to identify potential biomarkers for obstructive sleep apnea. *Ann Transl Med* 2022; **10**: 936–936.
- 123 Ljunggren M, Theorell-Haglöw J, Freyhult E, *et al.* Association between proteomics and obstructive sleep apnea phenotypes in a community-based cohort of women. *J Sleep Res* 2020; **29**: 1–10.
- 124 Cubillos-Zapata C, Martínez-García MÁ, Díaz-García E, *et al.* Obesity attenuates the effect of sleep apnea on active TGF-β1 levels and tumor aggressiveness in patients with melanoma. *Sci Rep* 2020; **10**: 15528.
- 125 Yu X, Li W, Ma Y, *et al.* GABA and glutamate neurons in the VTA regulate sleep and wakefulness. *Nat Neurosci* 2019; **22**: 106–19.
- 126 He S, Zhang X, Qu S. Glutamate, Glutamate Transporters, and Circadian Rhythm Sleep Disorders in Neurodegenerative Diseases. *ACS Chem Neurosci* 2019; **10**: 175–81.
- 127 Ralls F, Cutchen L. A contemporary review of obstructive sleep apnea. *Curr Opin Pulm Med* 2019; **25**: 578–93.
- 128 Kheirandish-Gozal L, McManus CJT, Kellermann GH, Samiei A, Gozal D. Urinary Neurotransmitters Are Selectively Altered in Children With Obstructive Sleep Apnea and Predict Cognitive Morbidity. *Chest* 2013; **143**: 1576–83.
- 129 Ledonne A, Mercuri NB. On the Modulatory Roles of Neuregulins/ErbB Signaling on Synaptic Plasticity. *Int J Mol Sci* 2019; **21**: 275.
- 130 Zhu J, Zhu Z, Ren Y, Dong Y, Li Y, Yang X. Role of the Nrdp1 in Brain Injury Induced by Chronic Intermittent Hypoxia in Rats via Regulating the Protein Levels of ErbB3. *Neurotox Res* 2020; **38**: 124–32.
- 131 Moreau PR, Örd T, Downes NL, *et al.* Transcriptional Profiling of Hypoxia-Regulated Non-coding RNAs in Human Primary Endothelial Cells. *Front Cardiovasc Med* 2018; **5**: 159.
- 132 Chen G, Zhang W, Li Y, *et al.* Hypoxia-induced autophagy in endothelial cells: a double-edged sword in the progression of infantile haemangioma? *Cardiovasc Res* 2013; **98**: 437–48.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: nächtlicher Zyklus der obstruktiven Schlafapnoe	12
Abbildung 2: Pathomechanismus der OSA im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen	15
Abbildung 3: Funktionen von lncRNAs	16
Abbildung 4: Analyse der Gesamt-RNA-Sequenzierung von vier OSAS-Patienten mit besonders hohem AHI, vor und nach einer polygraphisch überwachten Nacht; in Anlehnung an ZIETZER et al. ⁹⁸	27
Abbildung 5: Korrelationsanalyse der MRPL20-AS1-Expression und des AHI / ODI bei OSAS-Patienten; n=19; in Anlehnung an ZIETZER et al. ⁹⁸	27
Abbildung 6: Relative Expression von MRPL20-AS1 in HCAECs nach hypoxischer Schädigung ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM); *p < 0,05; in Anlehnung an ZIETZER et al. ⁹⁸	28

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schweregradeinteilung des OSAS gemäß der ICSD-3 ⁵	11
Tabelle 2: Entwicklung der geschlechterspezifischen Prävalenz der OSA	11

8 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Die Ergebnisse der Dissertation wurden vorab, in Absprache mit der Betreuerin, als Artikel in der wissenschaftlichen Zeitschrift International Journal of Cardiology veröffentlicht:

Zietzer A, Breitrück N, Düsing P, *et al.* The lncRNA MRPL20-AS1 is associated with severe OSAS and downregulated upon hypoxic injury of endothelial cells. *Int J Cardiol* 2022; **369**: 65–8.

<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2022.08.035>