

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut an der  
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Schwerpunkt Allergologie, Pneumologie und Mukoviszidose  
Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Zielen

**Rolle der microRNAs in der Pathophysiologie  
der Bronchiolitis obliterans**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Annalena Kochems

aus Hermeskeil

Frankfurt am Main, 2022

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	PD Dr. Martin Rosewich
Korreferent:	Prof. Dr. Gernot Rohde
Tag der mündlichen Prüfung:	06.09.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1 Seltene Lungenerkrankungen .....	7
1.2 Bronchiolitis obliterans .....	8
1.3 microRNA .....	10
1.4 Zielsetzung .....	13
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1 Patientenkollektiv .....	14
2.2 Studiendesign .....	15
2.3 Anamnese und klinische Untersuchung .....	15
2.4 Blutentnahme.....	16
2.5 Lungenfunktionsdiagnostik.....	16
2.6 Bronchospasmolyse.....	16
2.7 Sputum .....	16
2.7.1 Sputuminduktion .....	17
2.7.2 Sputumaufbereitung.....	17
2.7.3 Zelldifferenzierung.....	18
2.7.4 Cytometric Bead Array .....	18
2.8 miRNA .....	19
2.8.1 Aufbereitung und Sequenzierung .....	19
2.8.2 Signalwege, Ziel-Gene und Interaktionen.....	19
2.8.3 Statistik .....	20
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
3.1 Lungenfunktionsdiagnostik.....	21
3.2 Sputum .....	23
3.2.1 Zelldifferenzierung.....	23
3.2.2 Cytometric Bead Array .....	24
3.3 miRNA .....	25
3.3.1 Analyse der miRNA-Expression .....	25
3.3.2 Relevante Signalwege .....	28
3.3.3 Protein-Protein-Interaktion in Entzündungsprozessen.....	30
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>32</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>39</b>
<b>6. Abstract</b> .....	<b>40</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>41</b>
<b>8. Anhang</b> .....	<b>45</b>
<b>9. Danksagung</b> .....	<b>74</b>
<b>10. Lebenslauf</b> .....	<b>75</b>
<b>11. Schriftliche Erklärung</b> .....	<b>76</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Prozessierung von miRNAs
- Abb. 2: Lungenfunktionsdaten der Patienten und Kontrollen
- Abb. 3: Volcano Plot der miRNA-Expression
- Abb. 4: Unique Molecular Indexes (Patienten und Kontrollen) der vier ausgewählten miRNAs
- Abb. 5: Signalwege mit gemeinsamer Beteiligung der ausgewählten miRNAs
- Abb. 6: Protein-Protein-Interaktionen der Ziel-Proteine im TGF- $\beta$ - und Hippo-Signalweg
- Abb. 7: Heatmap ausgewählter Signalwege
- Abb. 8: Data Report (Originaldaten) der vier ausgewählten miRNAs

## Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Lungenfunktion der Patienten-/Kontrollgruppe
- Tabelle 2: Sputum-Zelldifferenzierung und Konzentration der Biomarker IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8
- Tabelle 3: Relevante Signalwege der ausgewählten, signifikanten miRNAs im Hinblick auf Entzündungsprozesse
- Tabelle 4: Lungenfunktion Patienten
- Tabelle 5: Lungenfunktion Kontrollen
- Tabelle 6: miRNA Unique Molecular Indexes Patienten
- Tabelle 7: miRNA Unique Molecular Indexes Kontrollen
- Tabelle 8: Ziel-Gene TGF- $\beta$ - und Hippo-Signalweg
- Tabelle 9: Relevante miRNA Selektion

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACHSE	Allianz Chronischer Seltener Erkrankungen
ANOVA	Analysis of Variance
CBA	Cytometric Bead Array
CO	Kohlenstoffmonoxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DLCO	Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenstoffmonoxid (CO)
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERS	European Respiratory Society
FEF75	Maximaler expiratorischer Fluss bei 75% der FVC
FEV1	Einsekundenkapazität
FEV1/FVC	Relative Einsekundenkapazität, Tiffenau-Index
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IRAK1	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MAPK1	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1
MAPK3	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 3
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
miRNA	microRNA
MMAD	Mittlerer aerodynamischer Massendurchmesser
mRNA	messengerRNA
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
padj	p-Wert adjusted (bereinigt)

pbonf	p-Wert mit Bonferroni-Korrektur
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIBO	Postinfektiöse Bronchiolitis obliterans
PIL	Pneumologisch-Immunologisches Labor
pri-miRNA	primary microRNA
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RISC	RNA-induced-silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RQ	Relative Quantifizierung
Tbc	Tuberkulose
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TGFBR1	Transforming Growth Factor $\beta$ receptor 1
TGFBR2	Transforming Growth Factor $\beta$ receptor 2
THP-1	Eine humane monozytische Zelllinie
TLC	Totale Lungenkapazität
TLR-4	Toll-like Rezeptor 4
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRAF-6	Tumor necrosis factor receptor associated factor 6
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UMI	Unique Molecular Index

# 1. Einleitung

## 1.1 Seltene Lungenerkrankungen

Von einer seltenen Erkrankung spricht man, wenn weniger als eine unter 2000 Personen von der jeweiligen Erkrankung betroffen ist. Aktuell sind über 7000 seltene Erkrankungen beschrieben, etwa 250 seltene Erkrankungen kommen zudem jährlich hinzu. In Europa sind mehr als 30 Millionen Menschen von einer seltenen Erkrankung betroffen.<sup>1,2</sup> Aufgrund der geringen Fallzahlen jeder einzelnen Erkrankung und dem entsprechend geringen Fokus sind die medizinischen Erkenntnisse über viele dieser seltenen Erkrankungen oft noch sehr gering. Für die meisten seltenen Erkrankungen gibt es bisher keine fundierten Therapieansätze; oft sind es lediglich symptom-orientierte Therapien, die die Lebensqualität der betroffenen Patienten verbessern sollen. Erfreulicherweise sind seltene Erkrankungen in den letzten Jahren mehr und mehr in das allgemeine Blickfeld gerückt. Bereits im Jahr 1997 wurde beispielsweise Orphanet - eine Datenbank und Referenzquelle, die Informationen zu seltenen Erkrankungen bereitstellt - in Frankreich gegründet. Solche Register sowie der Aufbau von Netzwerken fördern den Austausch von Experten auf nationaler und internationaler Ebene und führen zu einer Verbesserung der Forschungseffizienz.<sup>1</sup> 1999 gründeten in Deutschland Vertreter verschiedener Mitgliedsverbände den „Arbeitskreis Seltene Erkrankungen“, aus dem sich im Jahr 2004 die Allianz Chronischer Seltener Erkrankungen (ACHSE) entwickelte. ACHSE ist ein Netzwerk von Selbsthilfeorganisationen, das Menschen mit seltenen Erkrankungen vernetzt und die Erforschung von seltenen Erkrankungen und Therapiemöglichkeiten vorantreiben möchte.<sup>3</sup>

5% der seltenen Erkrankungen betreffen seltene Lungenerkrankungen, was etwa ein bis zwei Millionen betroffenen Menschen in Europa entspricht.<sup>4</sup> Heruntergerechnet auf die einzelnen Lungenerkrankungen sind die Fallzahlen gering, so dass die Planung und Durchführung klinischer Studien schwierig ist. Randomisierte, Placebo-kontrollierte Doppel-Blind-Studien - der Gold-Standard klinischer Studien - sind somit nicht immer möglich. Um eine ausreichend große Patientenkohorte zu rekrutieren sind oft multizentrische Studien notwendig, was

wiederum eine sehr umfangreiche Organisation, Koordination und Kommunikation zwischen den Kliniken und Zentren auf nationaler und internationaler Ebene erfordert.<sup>2</sup>

Als „Modellerkrankung“ mit Vorbildcharakter gilt sicherlich die Zystische Fibrose - auch Mukoviszidose - ebenfalls eine seltene Lungenerkrankung, die erstmals 1938 beschrieben wurde.<sup>5</sup> Über Jahrzehnte waren die Therapiemöglichkeiten auf eine symptomatische Therapie begrenzt, viele Patienten erreichten das Erwachsenenalter nicht. Durch Fokussierung auf diese seltene Erkrankung, klinisch wie auch in der Forschung, konnten die Ätiopathogenese aufgeklärt und neue Therapieansätze entwickelt werden.

## **1.2 Bronchiolitis obliterans**

Die Bronchiolitis obliterans ist eine seltene Lungenerkrankung, die erstmals 1901 von W. Lange beschrieben wurde.<sup>6</sup> Epithelverletzungen der kleinen Atemwege initiieren einen Entzündungsprozess, der durch sukzessive Umbauprozesse der Bronchiolen zu einer Einengung oder einer vollständigen Obliteration der Lumina führt.<sup>7</sup> Obwohl die Pathogenese der Bronchiolitis obliterans noch weitgehend unklar ist, scheint die anhaltende Entzündung eine entscheidende Rolle im Krankheitsverlauf zu spielen. Eine Kaskade von Cytokinen und Entzündungsmediatoren führt zu einer Akkumulation von Entzündungszellen.<sup>8,9</sup> Infolge der anhaltenden Inflammation ohne Resolution kommt es im Verlauf zu einer Proliferation mit intraluminalen Polypen (proliferative Bronchiolitis) oder fibrotischen Umbauprozessen (konstriktive Bronchiolitis).

Eine Vielzahl von Ursachen kann mit der Entstehung einer Bronchiolitis obliterans in Verbindung gebracht werden. Für die postinfektiöse Bronchiolitis obliterans (PIBO) sind vor allem Adenoviren Typ 1, 3, 7 und 21, Influenza, Mykoplasmen und Legionellen verantwortlich.<sup>7</sup> Auch im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis<sup>10-12</sup> und Sklerodermie<sup>13</sup> - insbesondere nach einer medikamentösen Therapie mit Penicillamin - sowie bei Morbus Crohn<sup>14</sup> oder dem Stevens-Johnson Syndrom<sup>15</sup> wurde die Entwicklung einer Bronchiolitis obliterans im Verlauf der jeweiligen Erkrankung beschrieben. Die Inhalation toxischer Substanzen kann ebenfalls

zu einer Bronchiolitis obliterans führen. Mitarbeiter einer Popcornfabrik erkrankten nach Inhalation von Diacetyl (Geschmacksverstärker bei der Produktion von Mikrowellen-Popcorn) an einer Bronchiolitis obliterans.<sup>16</sup> Weiterhin tritt Bronchiolitis obliterans vermehrt nach Knochenmark- und Herz-/Lungentransplantationen<sup>17</sup> im Sinne einer „graft versus host disease“ auf.

Der Schwerpunkt dieser Promotion liegt auf der postinfektiösen Bronchiolitis obliterans (PIBO). Seit 2016 besteht eine internationale Arbeitsgemeinschaft, unter anderem aus Kinderpneumologen, Radiologen, Pathologen, Psychologen und Physiotherapeuten, die sich sowohl klinisch als auch in verschiedenen Forschungsprojekten intensiv mit der PIBO beschäftigen und im Rahmen regelmäßiger Workshops die aktuellen Forschungsergebnisse diskutieren.<sup>18</sup> Die PIBO wird als ein Prozess mit persistierender Atemwegsobstruktion beschrieben mit sowohl funktionalem wie auch bildmorphologischem Nachweis einer Beteiligung der kleinen Atemwege. Erste Langzeitbeobachtungen zeigen neben einer anhaltenden Reduktion der Lungenfunktion bei persistierender Obstruktion auch einen geringen, jedoch insbesondere für die Patienten relevanten Anstieg der Lungenfunktion im Verlauf.<sup>19</sup> Auch Walther et al. konnten trotz Schwere und Chronizität der Erkrankung in einer Langzeitbeobachtung einen Anstieg der forcierten Vitalkapazität bei pädiatrischen Patienten nachweisen.<sup>20</sup>

Wie viele Menschen von PIBO betroffen sind ist schwer einzuschätzen, da es bisher keine systematische Erfassung der Patienten gibt. Eine Häufung der Erkrankung auf der südlichen Hemisphäre, insbesondere in Argentinien, Chile, Brasilien, Australien und Neuseeland sowie in Korea und den Vereinigten Staaten von Amerika - insbesondere durch Einwanderung - ist in der Literatur beschrieben.<sup>21-23</sup> Daraus lässt sich schließen, dass genetische Faktoren eine zentrale Rolle zu spielen scheinen.

Die Diagnose der PIBO wird in Zusammenschau aus Krankheitsgeschichte, der klinischen Symptome, der Lungenfunktionsdiagnostik und der Bildgebung gestellt, allerdings stellen Lungenbiopsie und Histopathologie nach wie vor den Goldstandard zur Diagnosestellung dar.<sup>18</sup> Da der Beginn der Erkrankung nicht charakteristisch ist, die Diagnosestellung schwierig und eine Lungenbiopsie eine hohe diagnostische Hürde ist, wird die Diagnose in der Regel erst gestellt, wenn sich das therapeutische Fenster bereits geschlossen hat. Da die

Erkrankung außerdem sehr selten ist, gibt es bisher keine klar definierten therapeutischen Richtlinien. Alle Ansätze sind bisher empirisch und variieren je nach Klinik. In einer Studie von Rosewich et al.<sup>9</sup> konnte gezeigt werden, dass vor allem eine neutrophile Entzündungsreaktion im Vordergrund steht. Auch Belachew et al. beschreiben eine dominierende neutrophile bronchiale Entzündungsaktivität.<sup>24</sup> Die Optimierung der Therapieprinzipien ist sehr herausfordernd, da bisher nur sehr wenig über die Pathophysiologie der PIBO bekannt ist.

Ein aktueller Forschungsschwerpunkt umfasst die Rolle der microRNAs in der pathophysiologischen Genese der PIBO.

### **1.3 microRNA**

MicroRNAs - kurz miRNAs - sind kleine, etwa 22 Nukleotide lange, nicht-kodierende RNAs, die eine wichtige Rolle in der Genregulation spielen.<sup>25-27</sup> Die Prozessierung bis hin zur ausgereiften miRNA umfasst mehrere Schritte im Zellkern und Zytoplasma. Winter et al. beschreiben einen geradlinigen, allgemein anerkannten Entstehungsprozess (Abb. 1)<sup>28</sup>. Gleichzeitig wird darauf hingewiesen, dass weitere Wege mit Abzweigungen und alternativen Prozessierungsschritten existieren, um eine reife miRNA zu generieren. Im klassischen Reifungsprozess entsteht das pri-miRNA-Transkript (pri-miRNA, primary miRNA) im Zellkern mithilfe der RNA Polymerase II oder III. Nach Spaltung der pri-miRNA durch den Drosha-DGCR8-Komplex entsteht die pre-miRNA, welche mithilfe des Exportin-5-Ran-GTP-Komplexes aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird. Dort wird die pre-miRNA durch den Dicer-TRBP-Komplex gespalten und es entsteht ein miRNA-Duplex. Der funktionelle Strang der reifen miRNA bildet gemeinsam mit Ago2 den sogenannten RNA-induced-silencing complex (RISC), welcher die Ziel-mRNA direkt beeinflussen kann.<sup>28</sup>

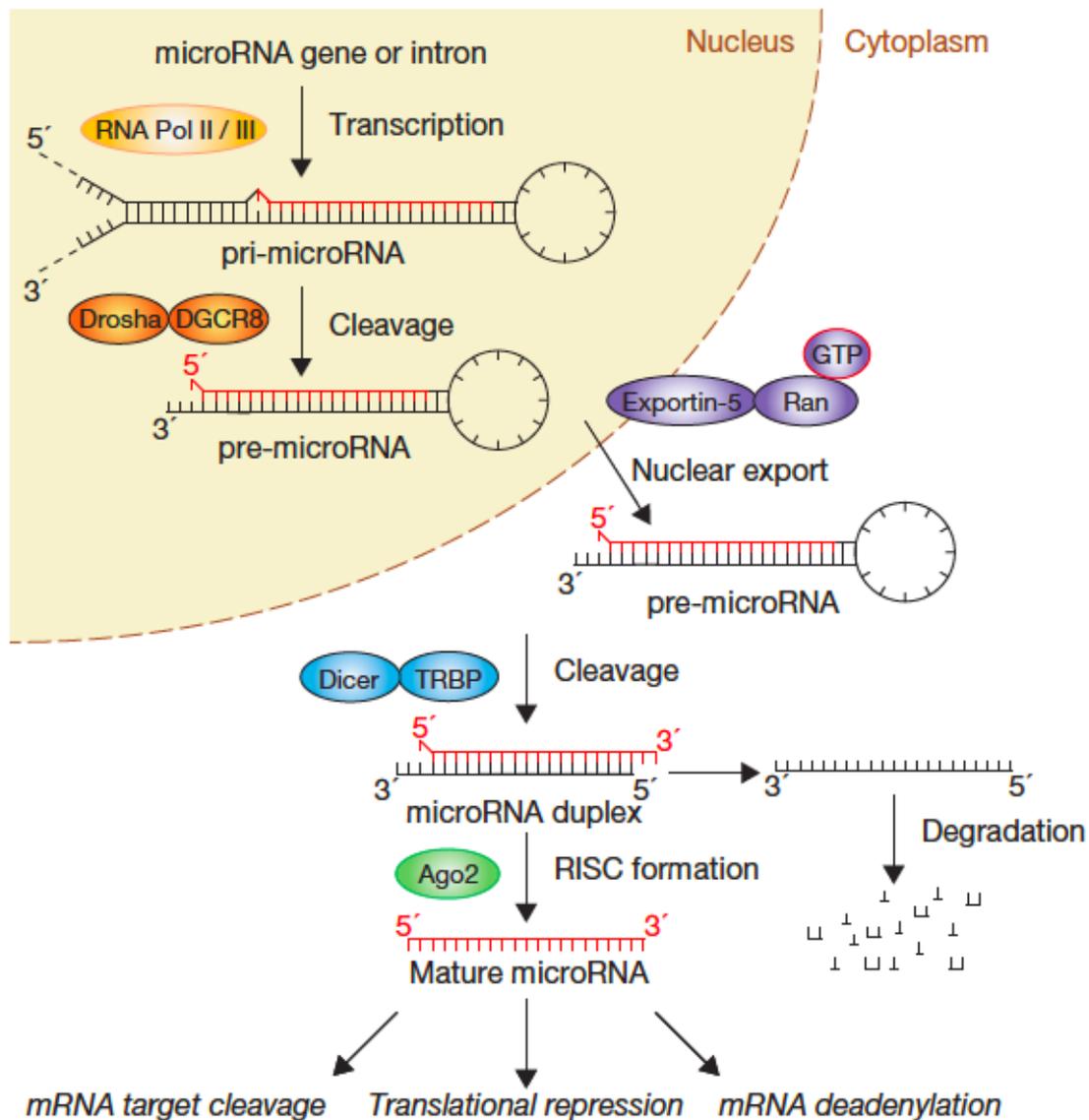


Abb. 1: Prozessierung von miRNAs. (aus Winter et al. - Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation)<sup>28</sup>

Die Genregulation kann an verschiedenen Stufen der Transkription beziehungsweise Translation stattfinden. Die meisten Studien widmen sich der miRNA-assoziierten post-transkriptionalen Herunterregulation von Genen. Es erscheinen jedoch zunehmend Publikationen, die sich mit miRNAs als Aktivatoren der Gen-Regulation beschäftigen.<sup>29</sup> Die Hoch-Regulation kann durch die Erhöhung der Stabilität der Ziel-mRNA und die Aktivierung der Translation - durch direkte Aktivierung oder indirekt durch De-Repression - erzielt werden. Eine einzelne miRNA kann die Gen-Regulation sowohl herauf- wie auch herunterregulieren. Unter bestimmten Bedingungen kann ein Gen - je

nach Umgebungsbedingungen - in beide Richtungen reguliert werden.<sup>30</sup> Vasudevan und Steitz beschreiben dies als ein „Oszillieren“ zwischen Repression und Aktivierung - angepasst an den jeweiligen Zellzyklus - und unterstreichen somit die bedeutende Mitwirkung der miRNAs in den Bereichen Entwicklung, Differenzierung und Karzinogenese.<sup>31</sup> Da jede miRNA in der Lage ist bis zu mehrere Hundert mRNAs zu beeinflussen, können Veränderungen der miRNA-Expression zu signifikanten Effekten führen.<sup>28,32</sup>

MiRNAs mit ähnlichen Sequenzen werden zu miRNA-Familien zusammengefasst. Aufgrund der Gemeinsamkeiten haben die miRNAs der gleichen Familie oft sich überschneidende Ziel-Gene, was wiederum zu einer verstärkten Beeinflussung der entsprechenden Ziel-Signalwege führt.<sup>33</sup> Das miR-17-92-Cluster beinhaltet beispielsweise die miRNAs miR-17, -18, -19a, -20, -19b und -92. Dieses Cluster ist mit der Entwicklung verschiedener Karzinome assoziiert und dort übermäßig exprimiert.<sup>34</sup>

Bezüglich möglicher Therapieoptionen durch gezielte Modulation der miRNAs gibt es verschiedene Strategien. Um bestimmte miRNAs auszuschalten, können diese gezielt durch spezifische miRNA-Antagonisten blockiert werden. Einen konträren Ansatz stellen die sogenannten „miRNA mimics“ dar, die eingesetzt werden, um ausgewählte miRNAs zu imitieren.<sup>35</sup> Trang et al. konnten in einem Maus-Modell zeigen, dass die systemische Zufuhr von let-7- und mir-34-Imitatoren zu einer Reduktion des Tumorwachstums bei einem Lungenkarzinom führen.<sup>36</sup>

Im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen spielen miRNAs eine zentrale Rolle in der Regulation der Expression von Proteinen, welche die Immunantwort modulieren.<sup>37</sup> Da sich die miRNA-Expressionsmuster bei gesunden und erkrankten Menschen vieler Krankheitsbilder unterscheiden, werden miRNAs - häufig in Kombination mit anderen Biomarkern - zur Diagnostik herangezogen. Der große Vorteil der miRNAs als Biomarker besteht darin, dass sie wenig invasiv aus Körperflüssigkeiten, beispielsweise Blut, gewonnen werden können.<sup>33</sup>

## **1.4 Zielsetzung**

In der Pathogenese seltener Lungenerkrankungen können Veränderungen der Immunantwort eine bedeutende Rolle spielen. Die Regulation immunologischer Prozesse unterliegt epigenetischen Mechanismen. In den letzten Jahren konnte die Rolle der miRNA in der posttranskriptionalen Regulation zunehmend aufgeklärt werden. MiRNA können sowohl als Biomarker als auch therapeutisch eingesetzt werden. Ziel der vorliegenden Promotion war es, Kandidaten-miRNA zu identifizieren, die spezifisch in der Diagnostik der postinfektiösen Bronchiolitis obliterans eingesetzt werden können. Es handelt sich um eine Pilotstudie mit der Hypothese, dass bei Patienten mit PIBO das Expressionsmuster der miRNAs alteriert ist. Nach Kompletsequenzierung wurden die miRNA-Profile der Patienten mit den Profilen einer alters- und geschlechtsadaptierten gesunden Kontrollgruppe verglichen. Zur Bestimmung der Nebenzielgrößen wurden die Lungenfunktionsdaten erhoben. Weiterhin erfolgte eine Sputuminduktion mit Aufbereitung der provozierten Sputumplugs.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Promotion wurden 19 Patientinnen und Patienten, die an PIBO erkrankt waren, aus der pneumologischen Ambulanz der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Frankfurt am Main eingeschlossen. Die Kontrollgruppe setzte sich alters- und geschlechtsadaptiert aus 18 gesunden Probanden zusammen. Der Altersmedian der Patientenkohorte lag bei 13 (Minimum 6 Jahre, Maximum 28 Jahre). In der gesunden Kontrollgruppe lag der Altersmedian ebenfalls bei 13 Jahren (Minimum 6 Jahre, Maximum 28 Jahre) (Tabelle 1).

Vorab wurden folgende Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt:

#### Einschlusskriterien:

- Informierte Einwilligung
- Alter  $\geq 6$ . und  $< 40$ . Lebensjahr
- Bekannte Bronchiolitis obliterans / keine Bronchiolitis obliterans (je nach Studiengruppe)
- Fähigkeit zur Lungenfunktionsprüfung nach ERS-Kriterien und zur Inhalation

#### Ausschlusskriterien

- Alter  $\leq 6$  und  $\geq 45$  Jahre zum Beginn der Studie
- Akute Erkrankung mit systemischer oder bronchialer Entzündung
- Andere chronische Krankheiten oder Infektionen (z.B. HIV, Tbc, Malignom)
- Schwangerschaft
- Bekannter Alkohol-, Drogen- und/oder Medikamentenmissbrauch
- Unfähigkeit zum Erfassen des Umfangs und Tragweite der Studie
- Teilnahme an einer anderen Studie

Vor Teilnahme an der Studie mussten die Teilnehmer beziehungsweise deren Erziehungsberechtigte eine Einverständniserklärung unterzeichnen.

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Goethe Universität Frankfurt genehmigt (Geschäfts-Nr. 166/16) und ist bei Clinical Trials (ClinicalTrials.gov) unter der Nummer NCT02627833 registriert. Das Ethik-Votum ist dieser Arbeit angehängt.

Im Rahmen der Studienvisite führten die Studienteilnehmer verschiedene Lungenfunktionstests durch und es erfolgte eine venöse Blutentnahme. Weiterhin wurde eine Sputuminduktion durchgeführt. Die anschließende Aufbereitung des Sputums erfolgte im Pneumologisch-Immunologischen Labor (PIL) der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Frankfurt.

## **2.2 Studiendesign**

Es handelt sich um eine Pilotstudie mit explorativem Setting. Die erhobenen Daten der Patienten wurden mit einer alters- und geschlechtsadaptierten gesunden Kontrollgruppe verglichen.

## **2.3 Anamnese und klinische Untersuchung**

Am Tag der Studienvisite wurden zunächst Größe und Gewicht erhoben, anschließend die Sauerstoffsättigung mittels Pulsoxymetrie bestimmt und die Herzfrequenz gemessen. In einer umfassenden Anamnese wurde die Krankheitsgeschichte der Patienten erfasst. Neben dem Krankheitsbeginn und der Ätiologie wurden zudem die aktuelle medikamentöse Therapie und die Ergebnisse der bildgebenden Diagnostik, insbesondere der Computertomographie des Thorax, erfasst. Anschließend erfolgte eine körperliche Untersuchung.

## **2.4 Blutentnahme**

Im Rahmen der Studienvisite wurde bei den Patienten und der gesunden Kontrollgruppe eine venöse Blutentnahme durchgeführt. Zur Bestimmung des miRNA-Profiles als Hauptzielgröße wurden den Patienten und Kontrollen zwei PAXgene® Blood RNA Blutentnahmeröhrchen (BD, Heidelberg, Deutschland) entnommen.

## **2.5 Lungenfunktionsdiagnostik**

Mittels Spirometrie (VIASYS Healthcare GmbH, Hoechberg, Deutschland) wurden die Lungenfunktionsparameter - verglichen mit einem alters-, geschlechts- und gewichtsadaptierten Kontrollwert - erfasst. In der Auswertung wurden unter anderem die forcierte Vitalkapazität (FVC), die Einsekundenkapazität (FEV1) und der maximale expiratorische Fluss bei 75% der forcierten Vitalkapazität (FEF75) erfasst. Anschließend wurde in einer separaten Messung die Diffusionskapazität, der sogenannte DLCO-Wert, ermittelt. Nach Einatmen einer dezidierten Menge Kohlenstoffmonoxid (0,28%) wurde der Teilnehmer aufgefordert, die Luft für zehn Sekunden anzuhalten. In dieser Zeitspanne wurde das über das Mundstück eingeatmete Kohlenstoffmonoxid auf die roten Blutkörperchen, die sich in den Kapillaren der Lunge befinden, übertragen. Über die Differenz aus ein- und ausgeatmetem CO konnte dann die Diffusionskapazität der Lunge berechnet werden.

## **2.6 Bronchospasmolyse**

Zur Durchführung der Bronchospasmolyse inhalierten die Teilnehmer 400 µg Salbutamol (4 Hübe, entsprechend 400 µg Salbutamol).

## **2.7 Sputum**

In der Dissertation „Biomarker der bronchialen Entzündung im induzierten Sputum“ von Ulrich Zissler wurde die Aufbereitung von Sputum in unserem Labor detailliert beschrieben.<sup>38</sup> Die Sputuminduktion und -aufbereitung wurden anhand der Arbeitsanweisung „Sputumgewinnung und Aufbereitung“ des Pneumologisch-Immunologischen Labors der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Frankfurt durchgeführt.<sup>39</sup>

### **2.7.1 Sputuminduktion**

Durch Inhalation von ansteigenden Konzentrationen von Kochsalzlösung (3%, 4% und 5%) wird ein Abhusten von Sputum aus den tieferen Atemwegen provoziert. Da hypertone Kochsalzlösung Husten provoziert und Bronchospasmen auslösen kann, wurde wie aufgeführt vor der Induktion des Sputums 400µg Salbutamol inhaliert.

Die Patienten inhalierten über sieben Minuten mit aufgesetzter Nasenklammer eine 3%-ige Natriumchlorid-Lösung. Der Ultraschallvernebler OMRON® NE-U17 (OMRON Medizintechnik, Mannheim, Deutschland) wurde auf Höchststufe der Verneblungsgeschwindigkeit eingestellt (MMAD 5,0 µm, Aerosol-Output 1ml/Minute). Anschließend wurde der Mund mit Wasser gründlich ausgespült und die Nase geputzt, um Zellen aus Mund- und Nasenbereich im Präparat möglichst zu vermeiden und den Anteil squamöser Zellen zu reduzieren. Die Patienten wurden aufgefordert, durch starkes Husten das Sputum abzuhusten und das Expektorat wurde in einer Petrischale aufgefangen.

Nach Durchführung einer Spirometrie wurde die Inhalation mit 4%- beziehungsweise 5%-iger Kochsalzlösung über je sieben Minuten wiederholt.

### **2.7.2 Sputumaufbereitung**

Die Aufbereitung des induzierten Sputums erfolgte innerhalb von zwei Stunden nach Sputuminduktion. Zunächst wurde das induzierte Sputum selektiert, um die benötigten Sputum-Plugs von der umgebenden Saliva zu trennen und in ein vorgewogenes leeres Falcon-Röhrchen zu transferieren. Anschließend wurde - angepasst an das Gewicht der selektierten Plugs - die vierfache Menge 0,1% Dithiothreitol-Lösung hinzugegeben. Durch vorsichtiges Aspirieren und anschließendes Vortexen für 15 Sekunden wurden die Plugs gelöst. Danach wurde das Falcon-Röhrchen auf Eis für 15 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die gewichtsadaptierte zweifache Menge an PBS hinzugegeben und die Probe erneut für 15 Sekunden gevortext. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl und Vitalität der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer (improved Marienfeld) verwendet.

Die filtrierte Probe wurde im nächsten Schritt bei 2000 rpm bei 4°C mit Bremse für 10 Minuten zentrifugiert, um einen zell- und ablagerungsfreien Überstand zu

erhalten. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen, vier Eppendorf-Gefäße wurden mit je 500µl befüllt und umgehend bei -80°C eingefroren, der restliche Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml mit PBS eingestellt. Nach kurzem Vortexen der Suspension wurden vier Zytospin-Präparate mit jeweils zweimal 75µl und 100µl der Zellsuspension hergestellt und bei 450rpm für sechs Minuten zentrifugiert (Shandon Cytospin 3, Shandon, Waltham, USA). Nach 15-minütigem Trocknen der Objektträger bei Raumtemperatur wurden die Präparate für zehn Minuten in Methanol fixiert.

Die übrige Zellsuspension wurde anschließend für 10 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert. Zu den Zellen der Suspension wurden 300µl RNACell protect gegeben. Nach kurzem Vortexen wurde die Probe in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80°C eingefroren.

### **2.7.3 Zelldifferenzierung**

Die fertigen Objektträger wurden nach Pappenheim (May-Grünwald-Färbung und Giemsa-Färbung) gefärbt und jeweils 400 Zellen ausgezählt.

### **2.7.4 Cytometric Bead Array**

Die Bestimmung der Zytokine im Sputumüberstand erfolgte mit dem Cytometric Bead Array (CBA). Die einzelnen Schritte wurden detailliert von U. Zissler beschrieben.<sup>38</sup> In der vorliegenden Studie wurden die Konzentrationen der Biomarker IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 im Sputumüberstand gemessen und mit einer gesunden Kontrollgruppe einer vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe verglichen.

## 2.8 miRNA

### 2.8.1 Aufbereitung und Sequenzierung

Die gesamte RNA inklusive der miRNA wurde mithilfe des miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellerhinweise isoliert. Die Konzentration der RNA wurde anschließend mit einem Nanodrop Lite Spektrometer (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) gemessen, zur Bestimmung der RNA-Qualität wurden das Agilent RNA 6000 Nano Kit und der Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Carla, CA, USA) verwendet.

Mithilfe des QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden miRNA-Bibliotheken generiert. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Qubit dsDNA Assay Kit mit Messung an einem Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) bestimmt. Die DNA-Qualität wurde analog zur RNA-Qualität unter Verwendung des Bioanalyzers (Agilent Technologies, Santa Carla, CA, USA) validiert. Die erstellten Bibliotheken wurden bei -20°C bis zur miRNA-Sequenzierung eingefroren. Die Sequenzierung erfolgte mittels Next Generation Sequencing, einem Hochdurchsatz-Sequenzierungsverfahren unter Verwendung des MiSeq Reagent Kit v3, dem PhiX Sequencing Control v3 und dem MiSeq™ Desktop Sequencer (alle Illumina Inc. San Diego, USA). Die Daten wurden mithilfe des Qiagen Web Portal Service prozessiert und analysiert. Weitere Analysen und Visualisierungen wurden mit R (Version 3.6.0, <https://cran.r-project.org/>) umgesetzt. In dieser Arbeit wurden miRNAs mit pbonf < 0,05 berücksichtigt.

### 2.8.2 Signalwege, Ziel-Gene und Interaktionen

Die Kyoto Enzyklopädie für Gene und Genome (KEGG) bietet eine Analyse der Signalwege der einzelnen miRNAs, die mit miRNet (miRTarBase v8.0) und DIANA-mirPath v3.0 durchgeführt wurden.<sup>40</sup> Im Programm DIANA-mirPath v3.0 wurden zwei verschiedene Algorithmen verwendet (TarBase v7.0, microT-CDS 5.0), um die Ziele von hsa-miR-146a-3p, hsa-miR-1287-5p, hsa-let-7b-3p, hsa-miR-27b-3p zu identifizieren. In der weiteren Analyse wurden die verschiedenen Signalwege bezüglich ihrer Beteiligung an Entzündungsprozessen

differenziert. Mithilfe der Software String v.11 wurden die Ziele gruppiert und eine Analyse des Netzwerkes durchgeführt um Ziel-Protein-Protein-Interaktionen zu visualisieren.<sup>41</sup>

### **2.8.3 Statistik**

MiRNA-Expressionslevels, die mittels qPCR bestimmt wurden, sind als relative Quantifizierung (RQ) der Gen-Expression dargestellt, wohingegen die anderen Datensätze als Median plus / minus der Standardabweichung dargestellt sind. Alle Versuche wurden mindestens dreifach durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben wurden Unterschiede zwischen den Gruppen mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse bestimmt. Berechnungen wurden unter Verwendung von R Version 3.2.3, GraphPad Prism 5 Software (GraphPad software, La Jolla, Kalifornien) und Excel (Microsoft Office, München, Deutschland) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde als  $p < 0,05$  definiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Lungenfunktionsdiagnostik

Die Lungenfunktionsdiagnostik ergab signifikante Unterschiede zwischen den an PIBO erkrankten Patienten und der gesunden Kontrollgruppe (Tabelle 1).

Tabelle 1: Lungenfunktion der Patienten-/Kontrollgruppe

	<b>Patienten</b>	<b>Kontrollen</b>
<b>Anzahl (n)</b>	19	18
<b>Alter (Jahre)</b>	13 (6 - 28)	14 (7 - 28)
<b>Geschlecht (m/w)</b>	13/6	10/8
<b>FVC (%)</b>	76,3*** (54,5 - 94,2)	90,8 (73,9 - 102,7)
<b>FVC (z score)</b>	-2,04*** (-3,84 - -0,46)	-0,77 (-2,23 - 0,24)
<b>FEV1 (%)</b>	59,8*** (40,2 - 96,9)	97,4 (73,5 - 116,4)
<b>FEV1 (z score)</b>	-3,42*** (-4,86 - -0,25)	-0,54 (-2,20 - -1,41)
<b>FEV1/FVC</b>	0,68*** (0,42 - 0,98)	0,88 (0,73 - 1,0)
<b>FEV1/FVC (z score)</b>	-2,19*** (-4,45 - 2,19)	0,33 (-2,26 - 2,49)
<b>FEF75 (%)</b>	25,1*** (9,2 - 195,7)	107,4 (41,3 - 184,7)
<b>FEF75 (z score)</b>	-3,20*** (-5,03 - 2,07)	0,21 (-2,30 - 2,01)

Dargestellt sind Median, Minimum / Maximum.

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 - Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe.

Besonders interessant ist der maximale expiratorische Fluss bei 75% der forcierten Vitalkapazität (FEF75), das heißt die maximale Atemstromstärke, nachdem 75% der forcierten Vitalkapazität bereits ausgeatmet sind. Die Kontrollgruppe zeigte regelrechte Werte mit einem Median von 107,4% (Minimum 41,3%, Maximum 184,7%), wohingegen die Patientenkohorte mit einem Median von 25,1% (Minimum 9,2%, Maximum 195,7%) signifikant niedrigere Werte erreichte.

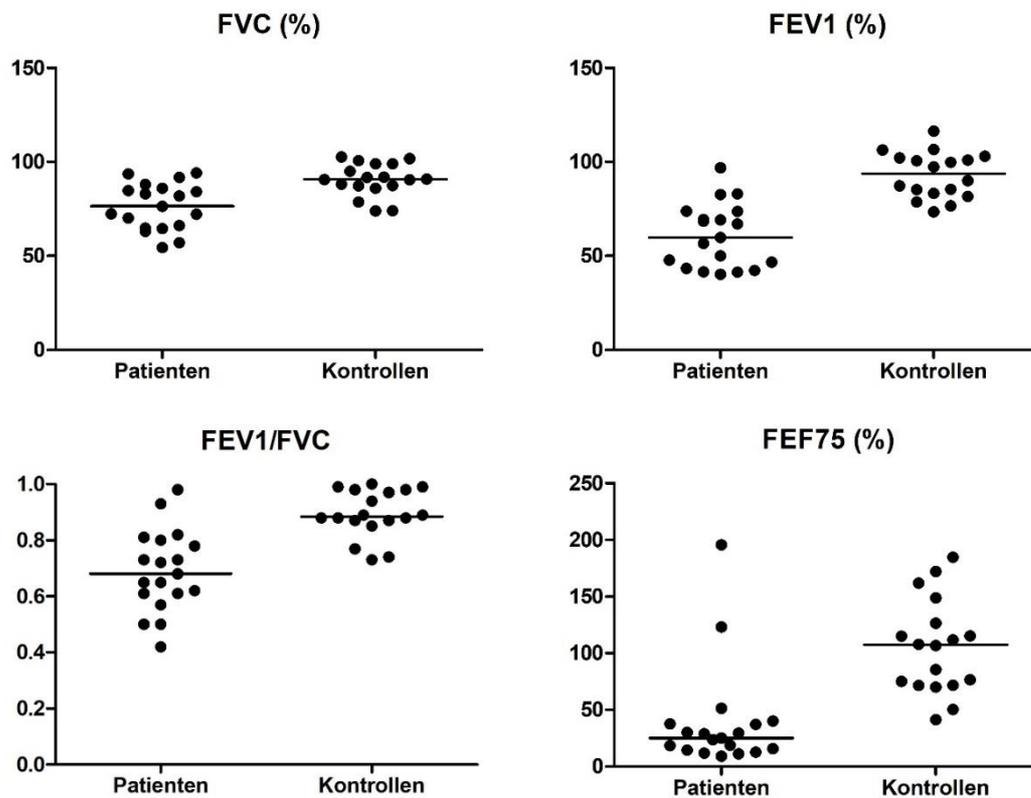


Abb. 2: Lungenfunktionsdaten der Patienten und Kontrollen. Dargestellt sind die Einzelwerte als Punkte sowie die Mediane als horizontale Linie.

## 3.2 Sputum

Tabelle 2: Sputum-Zelldifferenzierung und Konzentrationen der Biomarker IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8.

	Patienten	Kontrollen
<b>Neutrophile Granulozyten (%)</b>	82,5*** (15,0 - 96,0)	14,0 (1,0 - 49,0)
<b>Makrophagen (%)</b>	11,5*** (3,0 - 83,0)	86,0 (48,0 - 99,0)
<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/ml)</b>	1453,0** (48,8 - 7637,0)	193,7 (36,5 - 840,6)
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	825,6** (94,8 - 24810,0)	51,7 (0,0 - 250,0)
<b>IL-8 (pg/ml)</b>	35368,0*** (4906,0 - 155228,0)	2734,0 (366,1 - 13018,0)

Die Werte sind als Median und Spannweite angegeben.

Signifikanzen: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

### 3.2.1 Zelldifferenzierung

Die Zelldifferenzierung ergab bei den Patienten einen Anteil von 11,5% Makrophagen im Median (Minimum 3,0% Maximum 83,0%), wohingegen die Kontrollgruppe einen signifikant höheren Prozentanteil Makrophagen mit im Median 86% (Minimum 48,0%, Maximum 99,0%) enthielt. In der Patientenkohorte zeigte sich ein - im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe - signifikant höherer prozentualer Anteil neutrophiler Granulozyten von 82,5% im Median (Minimum 15,0%, Maximum 96,0%). Verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe (Median 14,0%, Minimum 1,0%, Maximum 49,0%) war der Anteil neutrophiler Granulozyten in der Patientenkohorte fast sechsmal so hoch wie in der gesunden Kontrollgruppe.

### **3.2.2 Cytometric Bead Array**

Mithilfe der CBA-Methode wurden aus den Sputumüberständen die Konzentrationen der Biomarker IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 bestimmt.

In der Patientenkohorte war die Konzentration von IL-1 $\beta$  mit 1453,0 pg/ml im Median (48,8 - 7637,0) gegenüber der gesunden Kontrollgruppe mit einem Median von 193,7 pg/ml (36,5 - 840,6) signifikant erhöht. Auch die Konzentration von IL-6 war in der Patientenkohorte mit einem Median von 825,6 pg/ml (94,8 - 24810,0) gegenüber der gesunden Kontrollgruppe mit einem Median von 51,7 pg/ml (0,0 - 250,0) signifikant erhöht. Die größte Signifikanz zeigte sich bei IL-8. Hier lag die Konzentration in der Patientenkohorte im Median bei 35368,0 pg/ml (4906,0 - 155228,0), wohingegen die Konzentration in der Kontrollgruppe lediglich bei 2734,0 pg/ml im Median (366,1 - 13018,0) lag.

### 3.3 miRNA

#### 3.3.1 Analyse der miRNA-Expression

Die Analyse ergab etwa 84 Millionen Reads mit einer durchschnittlichen Anzahl von 2.332.316 Reads je miRNA je Probe. Insgesamt wurden 835 miRNAs detektiert, davon 303 mit mehr als fünf Reads in jeder Probe und 527 miRNAs mit mehr als fünf Reads in mindestens 50% der Proben. Die Gruppen zeigten in der einfaktoriellen Varianzanalyse keine Unterschiede (ANOVA p-Wert > 0,1) bezüglich Störfaktoren (Alter, Geschlecht, RNA-Qualität) und Lesetiefe.

Die detaillierte Analyse der miRNA-Expression ergab eine Anzahl von 40 unterschiedlich regulierten miRNAs mit einer Signifikanz von  $p_{adj} \leq 0,05$ . 22 miRNAs waren in der Patientenkohorte gegenüber der gesunden Kontrollgruppe vermehrt exprimiert, 18 miRNAs waren vermindert exprimiert.

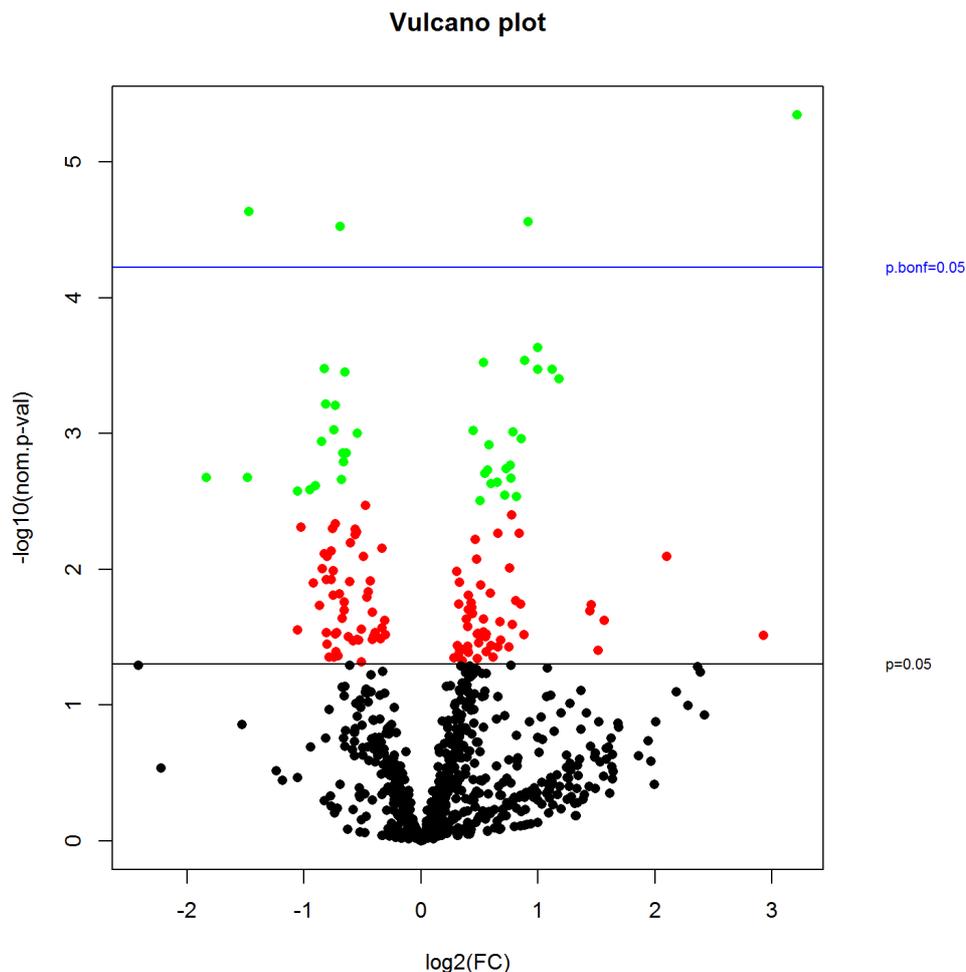


Abb. 3: Volcano Plot zur Darstellung der miRNA-Expression

In der Auswertung wurden die miRNAs berücksichtigt, die sich bei den Patienten und den Teilnehmern der gesunden Kontrollgruppe signifikant unterschieden (Signifikanz  $p < 0,05$  nach Bonferroni): hsa-miR-146a-3p, hsa-miR-1287-5p, hsa-let-7b-3p, und hsa-miR-27b-3p.

Eine Probe aus der Patienten-Kohorte wurde nicht berücksichtigt, da die Anzahl der Reads zu gering war. Die miRNAs hsa-let-7b-3p und hsa-miR-146a-3p waren in der Patienten-Kohorte gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant vermehrt exprimiert während die beiden miRNAs hsa-miR-1287-5p und hsa-miR-27b-3p gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant vermindert exprimiert waren.

Die Quantität der einzelnen miRNAs ist mithilfe von UMIs (Unique Molecular Indexes) präzise darstellbar. Während der Sequenzierung wurde jede miRNA mit einem UMI markiert, im Anschluss wurde ein Zahlenwert für die Anzahl der gelesenen UMIs ausgegeben.

Betrachtet man die miRNA hsa-let-7b-3p zeigte sich bei der Patienten-Kohorte ein signifikant erhöhter UMI von 262,5 im Median (62 - 496), wohingegen der Median der gesunden Kontrollgruppe bei 132 (42 - 211) lag. Die miRNA hsa-miR-146a-3p war in der Patienten-Kohorte mit einem UMI von 5,5 im Median (0 - 37) im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe mit einem UMI von 0 im Median (0 - 4) ebenfalls signifikant vermehrt exprimiert.

Die miRNA hsa-miR-1287-5p war in der Patientenkohorte mit einem UMI von 17,5 im Median (8 - 77) geringer exprimiert als in der gesunden Kontrollgruppe mit einem UMI von 23,5 im Median (9 - 339). Auch die miRNA hsa-miR-27b-3p war bei den Patienten mit einem UMI von 304 im Median (196 - 485) signifikant geringer ausgeprägt als in der gesunden Kontrollgruppe mit einem UMI von 430,5 im Median (143 - 741).

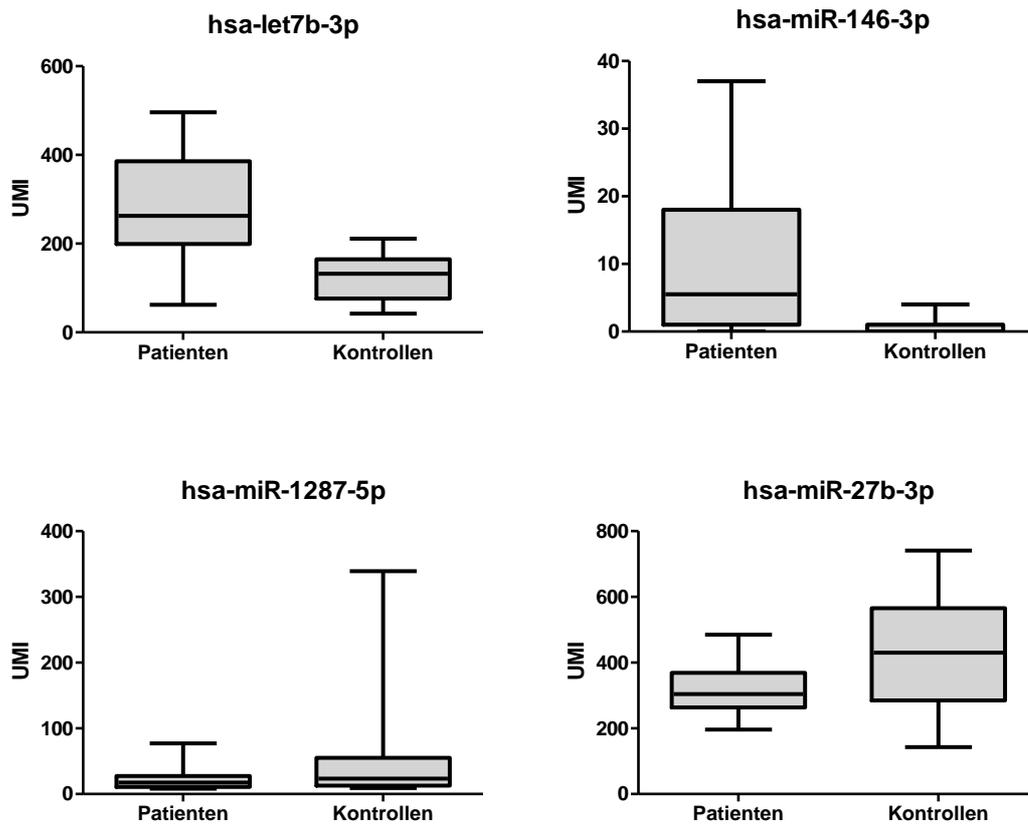


Abb. 4: In Abb. 4 sind die Unique Molecular Indexes (Patienten und Kontrollen) der vier ausgewählten miRNAs dargestellt.

### 3.3.2 Relevante Signalwege

Die Analyse der Signalwege erfolgte mithilfe der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) und DIANA-mirPath, einem Webserver zur Analyse von miRNA-Signalwegen. Mithilfe der Datenbanken Tarbase v7.0 und microT-CDS v5.0 konnten insgesamt 36 Signalwege detektiert werden, in denen die vier ausgewählten miRNAs involviert sind.

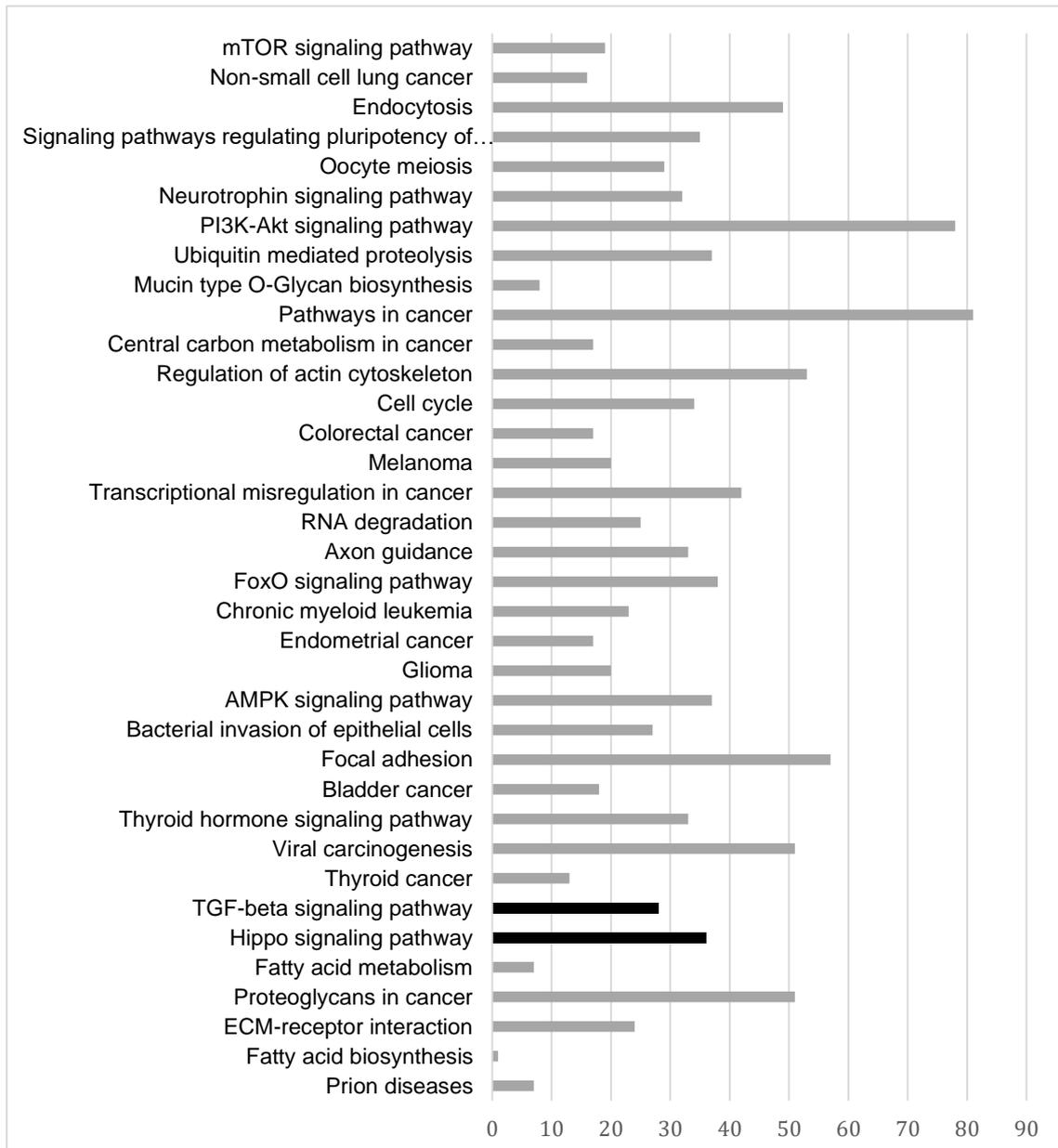


Abb. 5: Signalwege mit gemeinsamer Beteiligung der ausgewählten miRNAs (Quelle: DIANA mirPath v.3, Datenbanken Tarbase und microT-CDS). Auf der x-Achse ist die jeweilige Anzahl der Ziel-Gene dargestellt.

Bei detaillierter Analyse der Signalwege in Hinblick auf Entzündungsprozesse sind im TGF- $\beta$ -Signalweg alle vier miRNAs mit insgesamt 28 Ziel-Genen beteiligt. Weiterhin spielen die ausgewählten miRNAs auch im Hippo-Signalweg mit insgesamt 36 Ziel-Genen eine entscheidende Rolle.

Eine Auflistung der Ziel-Gene findet sich im Anhang (Tabelle 8).

Tabelle 3: Relevante Signalwege der ausgewählten, signifikanten miRNAs im Hinblick auf Entzündungsprozesse

<b>miRNA</b>	<b>Datenbank</b>	<b>KEGG Pathway</b>	<b>Anzahl Gene</b>
hsa-let-7b-3p	Tarbase v7.0		
hsa-miR-27b-3p	Tarbase v7.0	TGF- $\beta$ -Signalweg	28
hsa-miR-146a-3p	microT-CDS v5.0		
hsa-miR-1287-5p	microT-CDS v5.0		
hsa-let-7b-3p	Tarbase v7.0		
hsa-miR-27b-3p	Tarbase v7.0	Hippo-Signalweg	36
hsa-miR-146a-3p	microT-CDS v5.0		
hsa-miR-1287-5p	microT-CDS v5.0		
hsa-let-7b-3p	Tarbase v7.0		

Stand: November 2021



Es besteht eine signifikant hohe Anzahl an Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen (Protein-Protein-Interaktionen mit  $p < 1.0e^{-16}$ ) im Vergleich zu Interaktionen bei einer zufälligen Auswahl an Proteinen. Dies bestätigt die Vermutung, dass zwischen den Zielproteinen des in Entzündungsgeschehen relevanten TGF- $\beta$ - und Hippo-Signalwegs zahlreiche Interaktionen bestehen, die im Hinblick auf zukünftige Therapieoptionen relevant sein können. Insbesondere die Proteine TGFBR1, TGFBR2, PPP2R1A, PPP2R1B, BMPR2, BMP8B, SMAD4, SMAD7, MYC und ID2 spielen sowohl im TGF- $\beta$ -Signalweg wie auch im Hippo-Signalweg eine entscheidende Rolle.

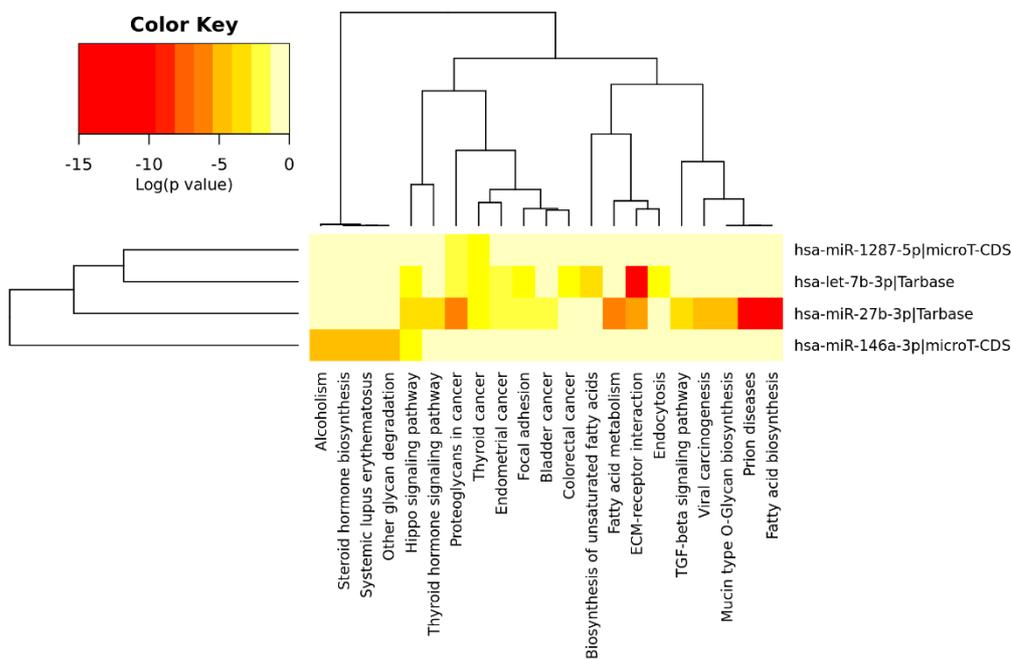


Abb. 7: Heatmap ausgewählter Signalwege mit gemeinsamer Beteiligung der ausgewählten miRNAs

## 4. Diskussion

Die Bronchiolitis obliterans ist eine seltene Lungenerkrankung, die mit einer chronischen Entzündung der kleinen Atemwege einhergeht. Die Diagnose der PIBO wird in Zusammenschau aus Krankheitsgeschichte, klinischer Symptomatik, Lungenfunktionsdiagnostik und Bildgebung gestellt, wobei die Lungenbiopsie und die Histopathologie nach wie vor den Goldstandard darstellen.

Ziel dieser Arbeit war es, Kandidaten-miRNA zu identifizieren, die als Biomarker in der Diagnostik der postinfektiösen Bronchiolitis obliterans herangezogen werden sowie in Zukunft eine mögliche Therapieoption darstellen können.

Die Ergebnisse der Lungenfunktionsdiagnostik zeigten als Zeichen einer Obstruktion bei den Patienten erwartungsgemäß signifikant verminderte FVC-, FEV1- und FEV1/FVC-Werte sowie ebenfalls signifikant verminderte FEF75-Werte. Der sehr geringe FEF75-Wert von nur 25,1% im Median in der Patientenkohorte spiegelt die immense Obstruktion der kleinen Atemwege wider. Die Atemstromstärke der Patienten ist auf etwa ein Viertel des Normalwertes reduziert, sobald 75% der forcierten Vitalkapazität bereits ausgeatmet sind. Vergleichbare Veränderungen zeigten auch vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe.<sup>9,42,43</sup> Die Obstruktion der kleinen Atemwege kann zudem mithilfe des Lung Clearance Index, der als ergänzende Lungenfunktionsdiagnostik herangezogen werden kann, sehr gut erfasst werden.<sup>24</sup>

Die Sputum-Analyse zeigte neben einer signifikanten Erhöhung der neutrophilen Granulozyten auch eine signifikante Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8. Im Gegensatz zu Michel, der nur eine signifikante Erhöhung von IL-8 beschrieb, fanden sich in unserer Patientenkohorte neben einer signifikanten Erhöhung von IL-8 auch signifikante Erhöhungen von IL-1 $\beta$  und IL-6. Dies könnte sich dadurch erklären lassen, dass Michel in seiner Arbeit Patienten unterschiedlicher Ätiologie auswertete,

wohingegen die Patientenkohorte in dieser Arbeit lediglich Patienten mit postinfektiöser Bronchiolitis obliterans umfasste.<sup>43</sup> Möglicherweise sind die Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine, insbesondere IL-1 $\beta$  und IL-6, bei Patienten mit postinfektiöser Bronchiolitis obliterans höher als bei Patienten mit Bronchiolitis obliterans anderer Ätiologie. Jerkic et al. konnten im Sputum der Patienten eine signifikante Erhöhung von Calprotectin - ein Protein, das von aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird - nachweisen und somit einen weiteren relevanten Biomarker in der Sputumdiagnostik identifizieren.<sup>44</sup>

### **miRNA**

Die Analyse der miRNA-Expression ergab insgesamt 40 unterschiedlich regulierte miRNAs ( $p_{adj} \leq 0,05$ ), die detailliert in Tabelle 9 im Anhang aufgelistet sind. 22 miRNAs waren in der Patientenkohorte vermehrt exprimiert, 18 miRNAs waren vermindert exprimiert.

Die vier miRNAs (hsa-let-7b-3p, hsa-miR-146a-3p, hsa-miR-1287-5p, hsa-miR-27b-3p) mit  $p_{bonf} < 0,05$  wurden in der weiteren Analyse berücksichtigt.

### **miRNA hsa-let-7b-3p**

In der Patientenkohorte zeigte sich im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine vermehrte Expression der miRNA hsa-let-7b-3p. In Zusammenhang mit der PIBO gibt es in der Literatur diesbezüglich bisher keine publizierten Studien. Da dem anhaltenden Entzündungsprozess in der Pathogenese der PIBO eine entscheidende Rolle zukommt, wurde die Literaturrecherche auf die Rolle der miRNA-Familie hsa-let-7 in Entzündungsprozessen erweitert.

Marques-Rocha et al. haben beschrieben, dass let-7b-Mimics die Expression von IL-6 und TNF in Monozyten reduzieren ( $p = 0,014$ ) und gleichzeitig IL-6 und TNF in Makrophagen hochregulieren ( $p < 0,05$ ). Es scheint sowohl eine pro- wie auch eine anti-entzündliche Rolle von let-7b zu geben, die mit dem jeweiligen Zelltyp zusammenzuhängen scheint.<sup>45</sup>

Teng et al. untersuchten den let-7b-Spiegel bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* in Proben der Magenschleimhaut und in Zelllinien des Magenepithels. Eine Infektion mit *Helicobacter pylori* war mit erniedrigten let-7b-Spiegeln assoziiert. Let-7b ist komplementär zur TLR4 (Toll-like Rezeptor 4)-mRNA und reguliert die TLR4-Expression durch post-transkriptionale Herunterregulation.

Eine Infektion mit *Helicobacter pylori* induziert die Expression von TLR4 und Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Durch eine Hochregulation von let-7b durch let-7b-Mimics konnte eine Herunterregulation von TLR4 und NF- $\kappa$ B erzielt werden, zudem wurde die Expression von IL-8, COX2- und CyclinD1 ebenfalls reduziert. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die TLR4-mRNA durch let-7b reguliert wird. Die Zufuhr von let-7b-Mimics oder let-7b-Inhibitoren führt zu einer umgekehrten Modifikation der TLR4-Protein-Expression, jedoch ohne signifikante Veränderung der TLR4-mRNA-Expression.<sup>46</sup>

Sato et al. beobachteten hingegen, dass sowohl die mRNA wie auch das TLR4-Protein in THP-1-Zellen, die mit let-7i-Mimics präpariert wurden, erniedrigt waren.<sup>47</sup>

Die teilweise widersprüchlichen Studienergebnisse zeigen, dass Mitglieder der let-7-Familie den Toll-like Rezeptor in verschiedenen Zellen auf unterschiedliche Art und Weise zu regulieren scheinen.

Interessanterweise publizierten Ideozu et al. 2019 eine Studie zu dysregulierten miRNAs bei Zystischer Fibrose. Passend zu unseren Ergebnissen zeigte sich auch hier eine vermehrte Expression von miRNAs der let-7-Familie. Die miRNAs hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c und hsa-let-7d-5p waren bei Patienten mit Zystischer Fibrose im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe hochreguliert. In der anschließenden Analyse der Netzwerke und Interaktionen zeigte sich, dass insbesondere hsa-let-7b-5p als wichtiger Knotenpunkt eine besondere Rolle zu spielen scheint.<sup>48</sup> Die vermehrte Expression der miRNA hsa-let-7b scheint sowohl bei der Zystischen Fibrose als auch bei der postinfektiösen Bronchiolitis obliterans eine wichtige Rolle zu spielen.

### **miRNA hsa-miR-146a-3p**

Neben der miRNA hsa-let-7b-3p war auch die miRNA hsa-miR-146a-3p bei PIBO signifikant vermehrt exprimiert. Auch wenn es im Zusammenhang mit der PIBO bisher keine veröffentlichten Studienergebnisse gibt, so finden sich bei einem von Wang et al. entworfenen Tiermodell, das eine obliterative Bronchiolitis nach Lungentransplantation simuliert, interessante Ergebnisse, die auch für die PIBO relevant sein könnten. Die beschriebene signifikante

Hochregulation der miR-146a im Tiermodell deckt sich mit unseren Ergebnissen.<sup>49</sup> Ähnlich wie bei der PIBO spielt auch bei der obliterativen Bronchiolitis nach Lungentransplantation eine chronische Entzündungsreaktion der kleinen Atemwege eine wichtige Rolle. Taganov et al. beschreiben eine regulatorische Rolle von miR-146a in der Signaltransduktion von Cytokinen. Die Aktivierung nachgeschalteter Gene und Expression von IRAK1- und TRAF-6-Proteinen wird durch posttranskriptionale Regulation abgeschwächt.<sup>50</sup> Die vermehrte Expression von miR-146a scheint vor allem mit chronischen Entzündungsprozessen verschiedener Krankheitsbilder assoziiert zu sein - beispielsweise zeigten sich bei Patienten mit Psoriasis ebenfalls signifikant erhöhte miR-146a-Level.<sup>51</sup>

Guo et al. beschreiben in ihrer 2010 veröffentlichten Arbeit die Rolle der miR-146a bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom, woraus sich trotz des unterschiedlichen Krankheitsbildes wichtige Erkenntnisse gewinnen lassen. Die Behandlung mit miR-146a in vitro konnte unter anderem die Expression der proinflammatorischen Proteine TNF- $\alpha$  und NF- $\kappa$ B induzieren. Im Gegensatz dazu konnte die Hemmung von miR-146a dieses Phänomen signifikant abschwächen. Daraus lässt sich schließen, dass miR-146a eine wichtige Rolle in der Regulation entzündlicher Immunantworten spielt, die mithilfe von miR-146a-Mimics und -Inhibitoren beeinflusst werden kann.<sup>52</sup>

### **miRNA hsa-miR-1287-5p**

Die Datenlage zu wissenschaftlichen Erkenntnissen bezüglich der miRNA hsa-miR-1287-5p ist bisher noch sehr dünn. Der Großteil der wenigen publizierten Artikel bezieht sich auf die Funktion von hsa-miR-1287 in der Tumorgenese, beispielsweise bei Mamma- und Larynxkarzinom sowie bei Glioblastomen.<sup>53-55</sup>

Bei PIBO zeigte sich im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine verminderte Expression der miRNA hsa-miR-1287-5p. Schwarzenbacher et al. beschreiben in ihrer Studie eine signifikante Herunterregulation von miR-1287-5p in Brustkrebszellen. Gleichzeitig ist ein niedriges Expressionslevel von miR-1287-5p mit einer schlechten Prognose assoziiert. miR-1287-5p reguliert unter anderem das zelluläre Wachstum. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Zufuhr von miR-1287-5p-Mimics das Tumorstadium hemmte, wohingegen die Zufuhr von miR-1287-5p-Inhibitoren zu einer Progredienz des

Tumorwachstums führte. miR-1287-5p-Mimics könnten somit als therapeutische Option als sogenannter „suppressiver Faktor“ bei Patienten mit dreifach negativem Mammakarzinom herangezogen werden.<sup>53</sup>

Auch Wolter et al. haben eine signifikant verminderte Expression von miR-1287-5p - neben einer verminderten Expression von miR-107, miR-146b und miR-346 - bei Patienten mit Astrozytom und Glioblastom beschrieben. Ein Ziel von miR-1287-5p ist der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR. Passend zu der detektierten Herunterregulation von miR-1287-5p bestand in 60-70% der Glioblastome eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors. Durch die verminderte Expression von miR-1287-5p kam es durch die fehlende Regulation beziehungsweise die fehlende Hemmung zu einer EGFR-Überexpression.<sup>54</sup>

Passend zu dem Ziel unserer Studie, potentielle Biomarker zur ergänzenden Diagnostik der PIBO zu detektieren, beschäftigten sich auch Wang et al. in ihrer Studie mit möglichen prädiktiven Biomarkern bei frühen Larynxkarzinomen. Es zeigte sich eine vermehrte Expression von hsa-miR-657 sowie eine verminderte Expression von miR-1287. Diese beiden miRNAs hatten eine hohe Sensitivität und Spezifität bezüglich der Differenzierung zwischen einem frühen Larynxkarzinom und normaler Schleimhaut und könnten somit als potentielle Biomarker geeignet sein.<sup>55</sup>

### **miRNA hsa-miR-27b-3p**

Auch die miRNA hsa-miR-27b-3p war bei PIBO vermindert exprimiert. Die bisher veröffentlichten Arbeiten zur miRNA hsa-miR-27b-3p beschäftigten sich vor allem mit onkologischen Krankheitsbildern wie beispielsweise dem kolorektalen Karzinom und dem Magenkarzinom. Eine Publikation zur miRNA-Expression bei Patienten mit Zystischer Fibrose bietet jedoch interessante Erkenntnisse mit Parallelen zu unserer Patientenkohorte. Stachowiak et al. konnten in ihrer im Jahr 2020 veröffentlichten Arbeit zeigen, dass es bei Patienten, die an Zystischer Fibrose erkrankt sind, eine signifikant veränderte miRNA-Expression während einer pulmonalen Exazerbation gibt.<sup>56</sup> Unter anderem war die Expression von miR-27b-3p während einer pulmonalen Exazerbation im Sputum verändert, wohingegen die im Blut bestimmten miRNA-Profile jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen einer

Exazerbation und der „stabilen Phase“ der Erkrankung zeigten. Weiterhin konnten Stachowiak et al. zeigen, dass eine Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* in der stabilen Phase - ohne Exazerbation - mit einer Überexpression von miR-27b im Sputum einhergeht. Die signifikant verminderte Expression von miR-27b während einer Exazerbation korrelierte mit einer erhöhten Inflammation sowie einer klinisch verminderten Lungenfunktion. Daraus lässt sich schließen, dass erhöhte miR-27b-Level protektiv wirken könnten, indem sie eine Entzündungsreaktion der Atemwege reduzieren und somit die Lungenfunktion verbessern.

Auch in unserer Studie zeigte sich in der Patientenkohorte eine signifikant verminderte Expression der miRNA hsa-miR-27b-3p. Unsere Ergebnisse beinhalten jedoch nur die miRNA-Expression im peripheren Blut. miRNA-Profile der Sputum-Diagnostik liegen nicht vor, da für die Sputum-Gewinnung der gesunden Kontrollgruppe kein positives Ethik-Votum vorlag. Für weitere Studien wäre eine ergänzende Untersuchung des Sputums hinsichtlich der miRNA-Expression sicherlich ein interessantes und sehr wichtiges Forschungsgebiet. Ebenso wäre es interessant zu untersuchen, ob durch miR-27b-3p-Mimics eine Reduktion der Entzündungsprozesse der Atemwege und eine Verbesserung der klinischen Lungenfunktion erzielt werden könnte.

### **Protein-Protein-Interaktion in Entzündungsprozessen**

Nach Analyse der - vor allem im Hinblick auf Entzündungsprozesse - relevanten Signalwege scheinen vor allem der Hippo-Signalweg sowie der TGF- $\beta$ -Signalweg als mögliche Angriffspunkte zukünftiger Therapieoptionen interessant zu sein. Der Hippo-Signalweg ist unter anderem an der Regulation der Reaktion auf Entzündungsgeschehen beteiligt. Yeung et al. beschreiben in ihrer Arbeit, dass Proteine, die zur Stabilisierung und erhöhten Aktivität des Hippo-Signalweges beitragen, zu einer Kontrolle des Entzündungsgeschehens beitragen können.<sup>57</sup>

Limitationen der Studienergebnisse ergeben sich aus der Seltenheit der Erkrankung und der resultierend geringen Fallzahl. Die seit 2012 bestehende Stiftung Starke Lunge fördert die Erforschung der PIBO und ermöglicht eine enge Zusammenarbeit verschiedener Schwerpunktzentren auf nationaler und internationaler Ebene. Aufgrund der Vernetzung und regem Austausch der Experten ist die Rekrutierung größerer Patientenkohorten möglich, was aufgrund der größeren Fallzahl wiederum zu einer besseren Aussagekraft der Studienergebnisse führt.

Erste Ergebnisse unserer Zusammenarbeit der Zentren in Frankfurt und Barcelona wurden im Februar 2022 von Duecker et al. unter dem Titel „Epigenetic regulation of inflammation by microRNAs in post-infectious bronchiolitis obliterans“ im Journal Clinical & Translational Immunology veröffentlicht.

## 5. Zusammenfassung

**Einleitung:** Die Bronchiolitis obliterans ist eine seltene Lungenerkrankung unterschiedlicher Ätiologie, die mit einer chronischen Entzündung der kleinen Atemwege einhergeht. Mit der Identifizierung von Kandidaten-miRNA sollen Biomarker evaluiert werden, die in der Diagnostik der postinfektiösen Bronchiolitis obliterans (PIBO) herangezogen werden sowie in Zukunft eine mögliche Therapieoption darstellen können.

**Material und Methoden:** 19 Patientinnen und Patienten mit PIBO sowie 18 gesunde Kontrollen wurden in die Studie eingeschlossen. Nach Komplettssequenzierung wurden die miRNA-Profile der Patienten mit den Profilen der alters- und geschlechtsadaptierten gesunden Kontrollgruppe verglichen. Als Nebenzielgrößen wurden die Lungenfunktion und Sputum-Biomarker erfasst.

**Ergebnisse:** Die Patientenkohorte wies signifikant niedrigere Werte in der Lungenfunktionsdiagnostik (Patienten, Median: FVC (%) 76,3<sup>\*\*\*</sup>, FEV1 (%) 59,8<sup>\*\*\*</sup>, FEV1/FVC 0,68<sup>\*\*\*</sup>, FEF75 (%) 25,1<sup>\*\*\*</sup>, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001) sowie eine signifikante Erhöhung der neutrophilen Granulozyten und der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 in der Sputumanalyse auf (Patienten, Median: Neutrophile (%) 82,5<sup>\*\*\*</sup>, IL-1 $\beta$  (pg/ml) 1453,0<sup>\*\*</sup>, IL-6 (pg/ml) 825,6<sup>\*\*</sup>, IL-8 (pg/ml) 35368,0<sup>\*\*\*</sup>). Die Analyse der miRNA-Expression ergab insgesamt 40 unterschiedlich regulierte miRNAs (padj  $\leq$  0,05). 22 miRNAs waren in der Patientenkohorte vermehrt exprimiert, 18 miRNAs waren vermindert exprimiert. Die vier miRNAs mit pbonf < 0,05 wurden in der weiteren Analyse berücksichtigt. Die miRNAs hsa-let-7b-3p und hsa-miR-146a-3p waren signifikant vermehrt exprimiert, wohingegen die miRNAs hsa-miR-1287-5p und hsa-miR-27b-3p signifikant vermindert exprimiert waren. Die identifizierten miRNAs spielen unter anderem eine Rolle im TGF- $\beta$ - und Hippo-Signalweg.

**Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse zeigen, dass das miRNA-Expressionsmuster bei Patienten, die an postinfektiöser Bronchiolitis obliterans erkrankt sind, alteriert ist. Die identifizierten miRNAs sind relevante Biomarker und können als potentielle Ziele von miRNA-Therapeutika in Betracht gezogen werden.

## 6. Abstract

**Introduction:** Bronchiolitis obliterans is a rare chronic lung disease of variable causes, leading to a chronic inflammation of the small airways. The identification of relevant miRNAs should evaluate biomarkers which could be used in diagnosis and treatment of post infectious bronchiolitis obliterans (PIBO) in the future.

**Materials and methods:** 19 patients with PIBO and 18 healthy controls were included. After next generation sequencing the miRNA-profiles were compared. Furthermore, the pulmonary function and the biomarkers of induced sputum were analysed.

**Results:** Patients with PIBO had significantly lower lung function values (patients, median: FVC (%) 76,3<sup>\*\*\*</sup>, FEV1 (%) 59,8<sup>\*\*\*</sup>, FEV1/FVC 0,68<sup>\*\*\*</sup>, FEF75 (%) 25,1<sup>\*\*\*</sup>, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001) and increased airway inflammation in induced sputum – indicated by the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 (patients, median: neutrophil granulocytes (%) 82,5<sup>\*\*\*</sup>, IL-1 $\beta$  (pg/ml) 1453,0<sup>\*\*</sup>, IL-6 (pg/ml) 825,6<sup>\*\*</sup>, IL-8 (pg/ml) 35368,0<sup>\*\*\*</sup>).

Next generation sequencing revealed 40 dysregulated miRNAs which passed significance threshold for  $p_{adj} \leq 0,05$  with 22 miRNAs being upregulated and 18 miRNAs being downregulated. Further analysis considered four miRNAs with  $p_{bonf} < 0,05$ . miRNAs hsa-let-7b-3p and hsa-miR-146a-3p were significantly upregulated whereas miRNAs hsa-miR-1287-5p and hsa-miR-27b-3p were significantly downregulated. These miRNAs are functionally implicated in TGF- $\beta$ - and hippo-signaling.

**Conclusion:** The results demonstrate an aberrant miRNA expression profile in patients with postinfectious bronchiolitis obliterans. The significant miRNAs are relevant biomarkers and can be considered to be potential targets for therapeutic approach.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Orphanet. <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>. Updated February 20, 2022.
2. Wästfelt M, Fadeel B, Henter J-I. A journey of hope: lessons learned from studies on rare diseases and orphan drugs. *Journal of Internal Medicine*. 2006;260(1):1-10.
3. ACHSE e.V. Allianz Chronischer Seltener Erkrankungen - ACHSE e.V. <https://www.achse-online.de/de/>. Updated February 20, 2022.
4. Harari S, Lau EMT, Tamura Y, Cottin V, Simonneau G, Humbert M. Rare (pulmonary) disease day: "feeding the breath, energy for life!". *European Respiratory Journal*. 2015;45(2):297-300.
5. Di Sant'Agnes PEA, Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas. *Progress pediatric study. American Academy of Pediatrics. Committee for the Study of Child Health Services*. 1948;(1 Vol.):160-176.
6. Lange W. Über eine eigentümliche Erkrankung der kleinen Bronchien und Bronchiolen. *Deutsches Archiv für klinische Medizin*. 1901;(vol. 70)342-364
7. Kurland G, Michelson P. Bronchiolitis obliterans in children. *Pediatric Pulmonology*. 2005;39(3):193-208.
8. Cazzato S, Poletti V, Bernardi F, Loroni L, Bertelli L, Cicognani A, et al. Airway inflammation and lung function decline in childhood post-infectious bronchiolitis obliterans. *Pediatric Pulmonology*. 2008;43(4):381-390.
9. Rosewich M, Zissler UM, Kheiri T, Voss S, Eickmeier O, Zielen S, et al. Airway inflammation in children and adolescents with bronchiolitis obliterans. *Cytokine*. 2015;73(1):156-162.
10. Geddes DM, Corrin B, Brewerton DA, Davies RJ, Turner-Warwick M. Progressive airway obliteration in adults and its association with rheumatoid disease. *The Quarterly Journal of Medicine*. 1977;46(184):427-444.
11. McCann BG, Hart GJ, Stokes TC, Harrison BD. Obliterative bronchiolitis and upper-zone pulmonary consolidation in rheumatoid arthritis. *Thorax*. 1983;38(1):73-74.
12. Penny WJ, Knight RK, Rees AM, Thomas AL, Smith AP. Obliterative bronchiolitis in rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*. 1982;41(5):469-472.
13. Boehler A, Vogt P, Speich R, Weder W, Russi EW. Bronchiolitis obliterans in a patient with localized scleroderma treated with D-penicillamine. *European Respiratory Journal*. 1996;9(6):1317-1319.
14. Bentur L, Lachter J, Koren I, Ben-Izhak O, Lavy A, Rosenthal E, et al. Severe pulmonary disease in association with Crohn's disease in a 13-year-old girl. *Pediatric Pulmonology*. 2000;29(2):151-154.
15. Secombe EL, Ardern-Jones M, Walker W, Austin S, Taibjee S, Fityan A, et al. Bronchiolitis obliterans as a long-term sequela of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in children. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2019;44(8):897-902.
16. Kreiss K. Flavoring-related bronchiolitis obliterans. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2007;7(2):162-167.
17. Whitehead B, Rees P, Sorensen K, Bull C, Higenbottam TW, de Leval M, et al. Incidence of obliterative bronchiolitis after heart-lung transplantation in

- children. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1993;12(6 Pt 1):903-908.
18. Jerkic S-P, Brinkmann F, Calder A, Casey A, Dishop M, Rosewich M, et al. Postinfectious Bronchiolitis Obliterans in Children: Diagnostic Workup and Therapeutic Options: A Workshop Report. *Canadian Respiratory Journal*. 2020;2020:5852827.
  19. Jerkic SP, Koc-Günel S, Herrmann E, Kriszeleit L, Eckrich J, Zielen S, et al. Long-term course of bronchial inflammation and pulmonary function testing in children with postinfectious bronchiolitis obliterans. *Pediatric Pulmonology*. 2021;56(9):2966-2972.
  20. Walther S, Rettinger E, Maurer HM, Pommerening H, Jarisch A, Jerkic SP, et al. Long-term pulmonary function testing in pediatric bronchiolitis obliterans syndrome after hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatric Pulmonology*. 2020;55(7):1725-1735.
  21. Smith KJ, Fan LL. Insights into post-infectious bronchiolitis obliterans in children. *Thorax*. 2006;61(6):462-463.
  22. Colom AJ, Teper AM, Vollmer WM, Diette GB. Risk factors for the development of bronchiolitis obliterans in children with bronchiolitis. *Thorax*. 2006;61(6):503-506.
  23. Kim CK, Kim SW, Kim JS, Koh YY, Cohen AH, White CW, et al. Bronchiolitis obliterans in the 1990s in Korea and the United States. *CHEST*. 2001;120(4):1101-1106.
  24. Belachew N, Jerkic S, Michel F, Schubert R, Zielen S, Rosewich M. Lungenfunktion, Lung Clearance Index und bronchiale Entzündung bei Kindern und Jugendlichen mit Bronchiolitis obliterans. *Pneumologie*. 2019;73(7):399-406.
  25. Bartel DP. MicroRNAs. *Cell*. 2004;116(2):281-297.
  26. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*. 2004;5(7):522-531.
  27. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018;141(4):1202-1207.
  28. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. 2009;11(3):228-234.
  29. Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2012;3(3):311-330.
  30. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *International Journal of Genomics*. 2014;2014:970607.
  31. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science (New York, N.Y.)*. 2007;318(5858):1931-1934.
  32. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008;455(7209):64-71.
  33. Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Seminars in Liver Disease*. 2015;35(1):3-11.

34. Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010;42(8):1348-1354.
35. Alipoor SD, Adcock IM, Garssen J, Mortaz E, Varahram M, Velayati A, et al. The roles of miRNAs as potential biomarkers in lung diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2016;791:395-404.
36. Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Slack FJ, et al. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Molecular Therapy*. 2011;19(6):1116-1122.
37. O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annual Review of Immunology*. 2012;30:295-312.
38. Zissler UM. *Biomarker der bronchialen Entzündung im induzierten Sputum*. Frankfurt am Main; 2012.
39. Lab-PIL, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Frankfurt. 5.5 Lab-PIL AA Labormethode 011 Sputumgewinnung und Aufarbeitung 160720.doc.
40. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Hatzigeorgiou AG, et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(W1):W460-6.
41. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Jensen LJ, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(Database issue):D808-15.
42. Eckrich J, Herrmann E, Voss S, Schubert R, Zielen S, Rosewich M. Short-Term Variation of Lung Function and Airway Inflammation in Children and Adolescents with Bronchiolitis Obliterans. *Lung*. 2016;194(4):571-579.
43. Michel F. *Lungenfunktion, Lung Clearance Index, bronchiale Entzündung und Calprotectin bei Patienten mit Bronchiolitis obliterans*. Frankfurt am Main; 2017.
44. Jerkic SP, Michel F, Donath H, Herrmann E, Schubert R, Zielen S, et al. Calprotectin as a New Sensitive Marker of Neutrophilic Inflammation in Patients with Bronchiolitis Obliterans. *Mediators of Inflammation*. 2020;2020:4641585.
45. Marques-Rocha JL, Garcia-Lacarte M, Samblas M, Bressan J, Martínez JA, Milagro FI. Regulatory roles of miR-155 and let-7b on the expression of inflammation-related genes in THP-1 cells: effects of fatty acids. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2018;74(4):579-589.
46. Teng G, Wang W, Dai Y, Wang S, Chu Y, Li J. Let-7b is involved in the inflammation and immune responses associated with Helicobacter pylori infection by targeting Toll-like receptor 4. *PLoS One*. 2013;8(2):e56709.
47. Satoh M, Tabuchi T, Minami Y, Takahashi Y, Itoh T, Nakamura M. Expression of let-7i is associated with Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of statins on let-7i and Toll-like receptor 4 signal. *Immunobiology*. 2012;217(5):533-539.
48. Ideozu JE, Zhang X, Rangaraj V, McColley S, Levy H. Microarray profiling identifies extracellular circulating miRNAs dysregulated in cystic fibrosis. *Scientific Reports*. 2019;9(1):15483.

49. Wang J, Cao H, Hong X, Chen GH, Fan HM, Li KF, et al. MicroRNA screening and functional study of obliterative bronchiolitis in a rat model simulating lung transplantation. *Genetics and molecular research : GMR*. 2015;14(4):19309-19316.
50. Taganov KD, Boldin MP, Baltimore D. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity*. 2007;26(2):133-137.
51. Sonkoly E, Wei T, Janson PCJ, Sääf A, Lundeberg L, Pivarcsi A, et al. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One*. 2007;2(7):e610.
52. Guo M, Mao X, Ji Q, Lang M, Li S, Zeng Q, et al. miR-146a in PBMCs modulates Th1 function in patients with acute coronary syndrome. *Immunology and Cell Biology*. 2010;88(5):555-564.
53. Schwarzenbacher D, Klec C, Pasculli B, Cerk S, Rinner B, Pichler M, et al. MiR-1287-5p inhibits triple negative breast cancer growth by interaction with phosphoinositide 3-kinase CB, thereby sensitizing cells for PI3Kinase inhibitors. *Breast Cancer Research*. 2019;21(1):20.
54. Wolter M, Werner T, Malzkorn B, Reifenberger G. Role of microRNAs Located on Chromosome Arm 10q in Malignant Gliomas. *Brain Pathology*. 2016;26(3):344-358.
55. Wang Y, Chen M, Tao Z, Hua Q, Chen S, Xiao B. Identification of predictive biomarkers for early diagnosis of larynx carcinoma based on microRNA expression data. *Cancer Genetics*. 2013;206(9-10):340-346.
56. Stachowiak Z, Wojsyk-Banaszak I, Jończyk-Potoczna K, Narożna B, Langwiński W, Szczepankiewicz A, et al. MiRNA Expression Profile in the Airways is Altered during Pulmonary Exacerbation in Children with Cystic Fibrosis-A Preliminary Report. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(6).
57. Yiu To Yeung, Faisal Aziz, Angelica Guerrero-Castilla, Sandro Arguelles. Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. *Current Pharmaceutical Design*;24(14):1449-1484.

## 8. Anhang

Tabelle 4: Lungenfunktion Patienten, Rohdaten

Patienten Frankfurt	FVC (L)	FVC (%)	VCmax (L)	VCmax (%)	FEV1 (L)	FEV1 (%)
DE-F-001	5,60	84,77	5,7	89,6	3,83	69,4
DE-F-002	4,45	86,03	4,55	86,5	3,26	73,86
DE-F-005	3,87	84,13	4,06	85,1	2,37	59,78
DE-F-006	4,26	93,65	4,26	91,6	2,62	67,11
DE-F-007	1,92	63,1	1,93	64,3	1,53	56,7
DE-F-009	3,47	72,14	3,66	84	2,82	69,21
DE-F-017	1,79	88,07	1,86	83,9	1,47	83,06
DE-F-020	2,05	64,62	2,05	67,5	2,01	73,65
DE-F-022	2,02	91,86	2,07	91,7	1,57	82,67
DE-F-023	0,85	70,2	0,88	72	0,55	50
DE-F-024	1,72	76,38	1,72	73,5	0,86	43,33
DE-F-025	2,03	54,47	2,13	61,4	1,32	41,4
DE-F-030	3,39	72,48	3,39	75,7	1,7	42,36
DE-F-033	1,41	94,18	1,41	88,4	1,31	96,92
DE-F-034	1,46	83	1,58	86,3	1,06	68,49
DE-F-041	2,88	81,94	2,9	81,6	1,21	40,24
DE-F-042	2,54	57	2,55	55,6	1,84	47,87
DE-F-043	1,45	64,81	1,04	51,4	0,82	41,6
DE-F-044	2,09	66,24	2,14		1,27	46,64

Patienten Frankfurt	FEV1/FVC	FEV1/FVC (%)	FEF75 (L/s)	FEF75 (%)
DE-F-001	0,68	80,81	0,84	28,85
DE-F-002	0,73	85,02	0,89	37,2
DE-F-005	0,61	70,47	0,4	18,39
DE-F-006	0,62	71,17	0,6	29,43
DE-F-007	0,80	89,36	0,51	30,1
DE-F-009	0,81	95,27	0,91	40,16
DE-F-017	0,82	93,21	0,6	51,29
DE-F-020	0,98	113,7	2,71	195,72
DE-F-022	0,78	89,58	0,38	37,62
DE-F-023	0,65	70,87	0,19	25,08
DE-F-024	0,50	56,30	0,11	9,16
DE-F-025	0,65	75,64	0,26	15,78
DE-F-030	0,50	58,14	0,25	11,06
DE-F-033	0,93	102,18	1,13	123,24
DE-F-034	0,73	82,00	0,21	23,55
DE-F-041	0,42	48,85	0,21	12,64
DE-F-042	0,72	83,61	0,41	18,87
DE-F-043	0,57	63,68	0,14	11,77
DE-F-044	0,61	70,15	0,22	14,55

Tabelle 5: Lungenfunktion Kontrollen, Rohdaten

Kontrollen Frankfurt	FVC (L)	FVC (%)	VCmax (L)	VCmax (%)	FEV1 (L)	FEV1 (%)
DE-X-401	2,98	73,91	3,16	79	2,79	78,66
DE-X-402	2,83	74,03	2,92	78,7	2,46	73,48
DE-X-403	5,59	91,92	5,59	94,1	4,97	97,44
DE-X-406	4,34	99,04	4,34	105,6	3,69	99,82
DE-X-408	2,38	86,07	2,4	85,9	2,08	85,34
DE-X-410	5,69	102,73	5,84	104,8	5	106,38
DE-X-411	1,57	87,26	1,67	92,2	1,38	87,37
DE-X-412	2,22	88,13	2,3	86,7	1,65	76,68
DE-X-413	1,64	90,51	1,7	95,7	1,6	100,65
DE-X-414	5,56	99,03	5,65	111,3	4,88	102,19
DE-X-416	1,40	90,98	1,63	99,9	1,4	101,02
DE-X-419	1,02	78,64	1,03	81,2	1	85,47
DE-X-420	1,52	95,09	1,57	94,2	1,48	103,06
DE-X-421	3,79	87,45	3,96	95,8	3,36	90,06
DE-X-422	5,20	100,87	5,32	111,5	5,14	116,42
DE-X-423	4,06	91,85	4,08	90,9	4	106,67
DE-X-424	4,01	101,83	4,02	108,5	2,91	83,37
DE-X-425	3,26	90,64	3,26	88,7	2,5	81,63

Kontrollen Frankfurt	FEV1/FVC	FEV1/FVC (%)	FEF75 (L/s)	FEF75 (%)
DE-X-401	0,94	105,56	1,7	76,49
DE-X-402	0,87	98,48	1,49	75,15
DE-X-403	0,89	104,84	2,94	111,68
DE-X-406	0,85	100,06	1,98	106,84
DE-X-408	0,87	98,49	1,08	71,76
DE-X-410	0,88	102,44	2,74	107,89
DE-X-411	0,88	99,27	0,71	71,62
DE-X-412	0,74	86,43	0,47	41,31
DE-X-413	0,98	110,57	1,32	148,95
DE-X-414	0,88	102,18	3,05	115,11
DE-X-416	1,00	110,36	1,04	115,37
DE-X-419	0,98	108,14	1,26	162
DE-X-420	0,97	107,73	1,12	126,56
DE-X-421	0,89	102,13	1,79	85,56
DE-X-422	0,99	114,62	4,27	172,1
DE-X-423	0,99	115,35	3,84	184,68
DE-X-424	0,73	81,26	1,1	50,34
DE-X-425	0,77	89,5	1,18	70,18

Tabelle 6: miRNA - UMI (Unique Molecular Indexes) Patienten

Patienten Frankfurt	hsa-let-7b-3p	hsa-miR-1287-5p	hsa-miR-146a-3p	hsa-miR-27b-3p
DE-F-001	236	10	15	272
DE-F-002	166	29	18	352
DE-F-005	202	24	2	275
DE-F-006	226	25	9	341
DE-F-007	261	9	14	296
DE-F-009	273	77	1	485
DE-F-017	411	11	1	460
DE-F-020	62	13	1	196
DE-F-022	170	27	37	322
DE-F-023	190	46	18	403
DE-F-024	375	14	1	250
DE-F-025	284	8	0	231
DE-F-030	417	14	0	268
DE-F-033	496	66	19	312
DE-F-034	264	8	9	341
DE-F-041	377	18	2	205
DE-F-042*				
DE-F-043	424	18	22	358
DE-F-044	241	17	0	279

\*Probe nicht verwertbar aufgrund zu geringer Reads

Tabelle 7: miRNA - UMI (Unique Molecular Indexes) Kontrollen

Kontrollen Frankfurt	hsa-let-7b-3p	hsa-miR-1287-5p	hsa-miR-146a-3p	hsa-miR-27b-3p
DE-X-401	137	13	0	576
DE-X-402	173	26	0	479
DE-X-403	123	43	0	402
DE-X-406	73	27	0	459
DE-X-408	65	12	3	143
DE-X-410	77	17	0	500
DE-X-411	149	39	0	371
DE-X-412	98	9	0	326
DE-X-413	62	12	0	287
DE-X-414	159	12	4	223
DE-X-416	108	21	1	741
DE-X-419	163	181	0	647
DE-X-420	127	339	1	643
DE-X-421	211	21	0	346
DE-X-422	169	93	1	492
DE-X-423	199	92	1	279
DE-X-424	42	19	0	188
DE-X-425	151	41	2	562

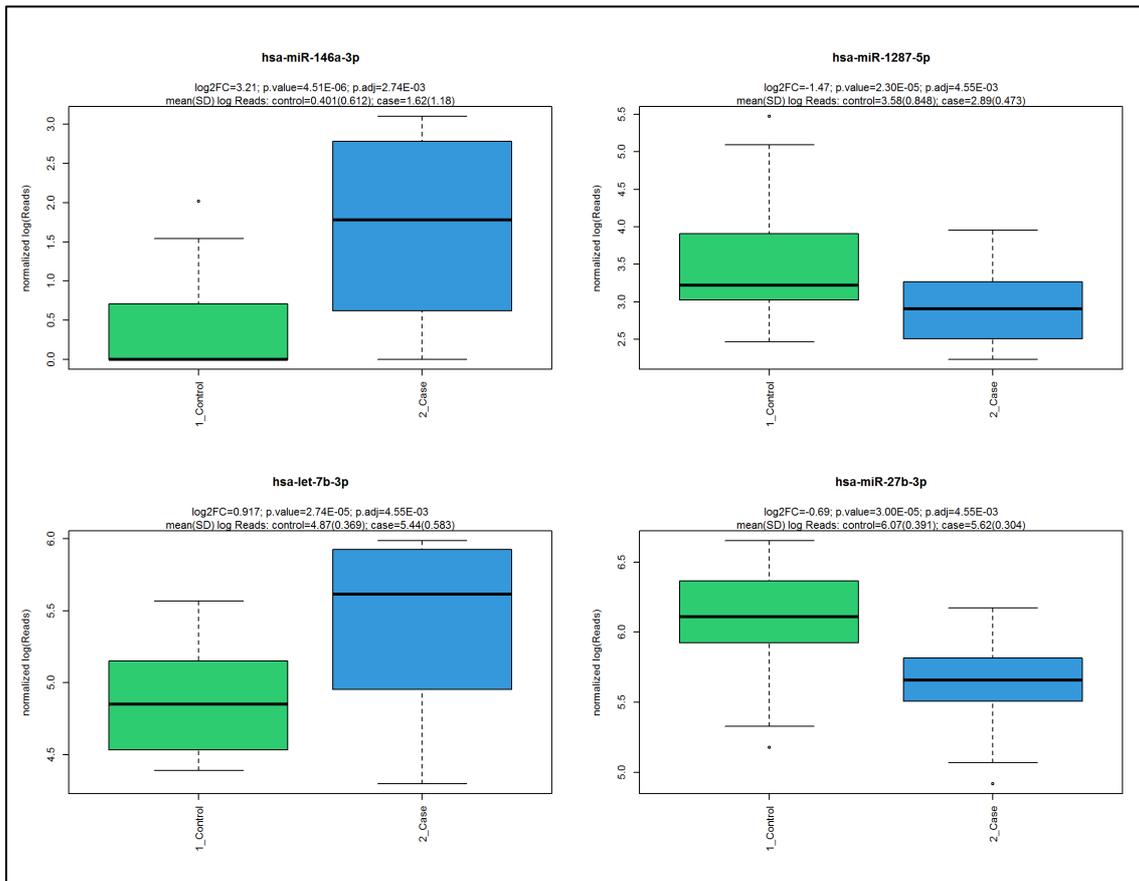
Tabelle 8: Ziel-Gene TGF- $\beta$ - und Hippo-Signalweg

Ziel-Gene TGF- $\beta$ -Signalweg	Ziel-Gene Hippo-Signalweg
FST	PPP1CA
TGFBR1	GSK3B
ID2	TGFBR1
SMAD9	ID2
THBS1	YAP1
CUL1	YWHAE
ID4	APC
RHOA	DLG1
BMP8B	YWHAG
ACVR1	PPP1CC
ACVR2B	GLI2
SMAD4	SNAI2
MYC	YWHAB
PPP2R1A	TEAD3
SMURF1	WWC1
ZFYVE9	WWTR1
MAPK3	FZD3
SP1	BMP8B
ACVR1C	LIMD1
BAMBI	MPP5
LTBP1	FZD4
ID3	CSNK1D
SMAD7	CCND1
MAPK1	SMAD4
PPP2R1B	CTNNB1
TGFBR2	MYC
BMPR2	PPP2R1A
RPS6KB1	FRMD6
	TEAD1
	SMAD7
	MOB1A
	PPP2R1B
	PARD6B
	TGFBR2
	WNT9A
	BMPR2

Tabelle 9: Relevante miRNA Selektion, Rohdaten

miRNA	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
hsa-miR-27b-3p	375,2	0,345003103	0,082658755	4,173824	2,99529E-05	0,004545354
hsa-let-7b-3p	200,3	-0,458714732	0,109382622	-4,19367	2,74476E-05	0,004545354
hsa-miR-16-5p	283205,5	0,324981794	0,090951632	3,573128	0,000352743	0,019464982
hsa-miR-30c-5p	25631,3	-0,442569377	0,122171218	-3,62253	0,000291731	0,019464982
hsa-let-7g-5p	12606,9	0,412691643	0,115047243	3,587149	0,000334313	0,019464982
hsa-miR-30b-5p	4027,8	-0,499114262	0,139192762	-3,58578	0,000336076	0,019464982
hsa-miR-335-5p	439,4	-0,499504024	0,135776726	-3,67886	0,000234276	0,019464982
hsa-miR-326	133,3	-0,267341907	0,073974243	-3,61399	0,000301525	0,019464982
hsa-let-7i-5p	31373,2	0,3662884	0,10705279	3,421568	0,000622612	0,026994658
hsa-miR-26b-5p	7886,0	0,405885652	0,118440633	3,426912	0,000610486	0,026994658
hsa-let-7f-5p	21794,9	0,371393758	0,112338655	3,306019	0,000946316	0,033533599
hsa-miR-17-5p	528,2	0,272812114	0,082868607	3,292104	0,000994407	0,033533599
hsa-miR-126-3p	16667,9	0,425307872	0,130835517	3,250707	0,001151186	0,0349385
hsa-miR-186-5p	4765,9	-0,290672232	0,089855816	-3,23487	0,001216965	0,035176077
hsa-let-7a-5p	67231,1	0,318654536	0,099687176	3,196545	0,001390842	0,036845938
hsa-miR-183-5p	1068,7	0,332201218	0,103960764	3,195448	0,001396139	0,036845938
hsa-miR-93-5p	50218,1	0,339615602	0,110809323	3,064865	0,002177684	0,041307937
hsa-miR-378a-5p	469,5	-0,363689088	0,116583447	-3,11956	0,001811212	0,041307937
hsa-miR-199a-5p	172,8	-0,408999591	0,137338868	-2,97803	0,002901054	0,045152297
hsa-miR-29c-5p	363,7	-0,252510041	0,085461168	-2,95468	0,003129978	0,047497418
hsa-miR-3613-3p	53,93138625	-0,274119398	0,088540697	-3,09597	0,001961698	0,041307937
hsa-miR-2277-3p	50,02957551	-0,224045131	0,067817018	-3,30367	0,000954277	0,033533599
hsa-let-7f-1-3p	36,78739567	-0,589837765	0,166513744	-3,54228	0,000396689	0,020065854
hsa-miR-1287-5p	35,82420103	0,735408558	0,173727236	4,233122	2,3047E-05	0,004545354
hsa-miR-5695	27,39015506	-0,427979052	0,13110443	-3,26441	0,00109691	0,0349385
hsa-miR-4664-5p	22,89654511	-0,357179801	0,119786957	-2,98179	0,002865665	0,045152297
hsa-miR-190b	22,3551847	0,330958369	0,104959332	3,153206	0,001614879	0,040842993
hsa-miR-26a-2-3p	19,27782344	-0,383858735	0,1250616	-3,06936	0,002145199	0,041307937
hsa-miR-4510	18,91915252	0,528156443	0,175818619	3,003985	0,002664687	0,043715273
hsa-miR-627-3p	16,1667161	-0,394841168	0,119783112	-3,2963	0,000979671	0,033533599
hsa-miR-4677-3p	14,45620141	-0,381954905	0,121800976	-3,13589	0,001713313	0,041307937
hsa-miR-4753-3p	13,53843298	-0,326868796	0,107221846	-3,04853	0,002299655	0,042046791
hsa-miR-6866-3p	11,78152296	-0,286480027	0,092046537	-3,11234	0,001856112	0,041307937
hsa-miR-199b-3p	11,68558585	0,474816848	0,15773569	3,010206	0,002610709	0,043715273
hsa_piR_001312	11,64543214	-0,300231066	0,09871628	-3,04135	0,002355174	0,042046791
hsa-miR-590-3p	9,054515992	0,739869776	0,240782192	3,072776	0,002120775	0,041307937
hsa-miR-20a-3p	7,769941421	0,45006787	0,14847929	3,031183	0,002435977	0,042246805
hsa_piR_015026	5,366444794	-0,55952552	0,156065952	-3,58519	0,000336838	0,019464982
hsa-miR-218-5p	4,882772216	0,91573236	0,297907916	3,073877	0,002112964	0,041307937
hsa-miR-146a-3p	4,247566406	-1,607291376	0,350453465	-4,58632	4,51129E-06	0,002738354

Abb. 8: Data Report (Originaldaten) der vier ausgewählten miRNAs





Universitätsklinikum · Theodor-Stern-Kai 7 · 60590 Frankfurt

Allergologie, Pneumologie und Mukoviszidose  
Zentrum für Kinder und Jugendmedizin  
Herr Dr. Martin Rosewich  
ZKi

**Geschäfts-Nr.: 166/16 (Bitte stets angeben!)**

**Titel:** Rolle der microRNAs in der Pathophysiologie der Bronchiolitis obliterans (BO)

**VOTUM**

Sehr geehrter Herr Doktor Rosewich,

die Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main hat sich am 11.04.2016 mit Ihrem vorgenannten Antrag befasst und um einige Änderungen und Ergänzungen in Protokoll und Patienteninformation gebeten.

Nachdem Sie mit Schreiben vom 01.06.2016 die entsprechend geänderten Fassungen der Studienunterlagen vorgelegt haben, kann ich Ihnen mitteilen, dass nunmehr keine berufsrechtlichen und berufsethischen Bedenken gegen die Durchführung der oben genannten Studie bestehen.

**Wir bewerten die Studie zustimmend.**

Eine Information über den Abschluss der Studie wird erbeten.

Nachfolgend sind die Mitglieder der Ethik-Kommission aufgeführt, die in der Sitzung am 11.04.2016 die o. g. Studie beurteilt haben:

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. med. S. Harder (Klinische Pharmakologie)  
Herr Prof. Dr. med. L. Bergmann (Innere Medizin)  
Herr Prof. Dr. med. H. Bratzke (Rechtsmedizin)  
Herr Prof. Dr. med. S. Fichtlscherer (Innere Medizin)  
Herr H. Gaede (Rechtsanwalt)

**Ethik-Kommission**

**Vorsitz:**  
Prof. Dr. Sebastian Harder

**Geschäftsführung:**  
Dr. Annette Malsch

**Bearbeitung des Vorgangs:**  
Vardopoulos

Dienstag, 14. Juni 2016

**Geschäftsstelle**

**Sekretariat:**  
Angela Vardopoulos  
Tel.: 069 / 6301-3758  
Fax: 069 / 6301-83434  
E-Mail: ethikkommission@kgu.de

**Mitarbeiter/innen:**  
Durchwahl  
Tanja Berger Tel.: 3889  
Myriam Ruggeri Tel.: 7239  
Sabine Stermler Tel.: 3884  
Fax: 83434  
E-Mail: ethikkommission@kgu.de

<http://ethik-kommission.klinik.uni-frankfurt.de>

**Lieferadresse:**  
Ethik-Kommission des  
Fachbereichs Medizin  
Universitätsklinikum der  
Goethe-Universität  
Theodor-Stern-Kai 7  
Haus 1, 2. OG, Zi. 223/224  
60596 Frankfurt am Main

**Öffnungszeiten f. Anlieferung:**  
Montag bis Donnerstag:  
10:00 bis 16:00 Uhr  
Freitag:  
9:00 bis 13:00 Uhr

166-16bB.docx

U 2a

Herr Prof. Dr. med. J. Lötsch (Klinische Pharmakologie)  
Herr Prof. Dr. med. T. Schmitz-Rixen (Chirurgie)  
Frau R. Wessinghage (Rechtsanwältin)  
Herr Prof. Dr. med. S. Zielen (Kinderheilkunde)

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. med. Sebastian Harder  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Die Stellungnahme der Ethik-Kommission erfolgte aufgrund folgender eingereichter  
Unterlagen:

<b>Dokument:</b>	<b>Version/ Nr.:</b>	<b>datiert vom:</b>
Protokoll	2	01.06.2016
Patienteninformation und Einwilligungserklärung	2	01.06.2016
Patienteninformation und Einwilligungserklärung Eltern	2	01.06.2016
Patienteninformation und Einwilligungserklärung Kinder und Jugendliche	1	24.03.2016
Fragebogen Jugendliche 13-18 Jahre	4.0	02/2014
Fragebogen Kinder 8-12 Jahre	4.0	02/2014
Fragebogen chILD Modul – self report 13-18 Jahre		02/2014
Fragebogen Bronchiolitis oberans	ohne	ohne

Patientennr: |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

# Clinical Report Form



## **Rolle der microRNAs in der Pathophysiologie der Bronchiolitis obliterans (BO)**

Leiter Dr. med. Martin Rosewich

Prüfärzte Prof. Dr. med. S. Zielen  
Dr. med. O.Eickmeier

Doktorand Cand. med. Annalena Kochems

Sponsor Universitätsklinikum Frankfurt

Inhalt: 1.) Einverständniserklärung (-en) Eltern/ Patient  
2.) CRF zur Visite 01  
3.) Fragebögen  
4.) Dokumentation der Begleitmedikation  
5.) Dokumentation von AE/ SAE  
6.) Lungenfunktionsuntersuchungen  
7.) Laborbefunde  
8.) Sputum-Protokoll

Patientennr: |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

## Visite 01

Datum: \_\_\_\_\_.\_\_\_\_.\_\_\_\_\_

Uhrzeit: \_\_\_\_:\_\_\_\_ Uhr

Alter: \_\_\_\_\_ Jahre

**Geschlecht:** M |\_\_| W |\_\_|

**Rasse:** kaukasisch – europäisch |\_\_|  
Kaukasisch – nicht-europäisch |\_\_|  
Orientalisch |\_\_|  
Schwarz |\_\_|

**Körpermaße:** Gewicht: \_\_\_\_\_ kg Länge: \_\_\_\_\_ cm BMI: \_\_\_\_\_

### Untersuchungsbefund:

Atemfrequenz: \_\_\_\_\_ /min Puls: \_\_\_\_\_ /min SaO2: \_\_\_\_\_ %

Auskultation Lunge: frei |\_\_| Knistern |\_\_| andere: \_\_\_\_\_  
Pfeifen |\_\_| Lokalisation: \_\_\_\_\_

Einziehungen: nein |\_\_| ja |\_\_| Lokalisation: \_\_\_\_\_

Andere Auffälligkeiten: nein |\_\_| ja |\_\_|

### Blutentnahme erfolgt:

Ja  Nein

1 x EDTA 1 x BB

2 x Serum weiß Labor Schubert (RAST >3 Jahre, Ges.-IgE), CBA  
Entzündungsprofil

1 x Serum braun Routine klinische Chemie mit CrP, Leber- und Nierenwerte

2 x miRNA

Patientennr: |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

- Anamnese:**
1. Bekannte Bronchiolitis obliterans?  Ja  Nein  
a) Seit wann: \_\_\_\_\_
  2. Vermuteter / gesicherter Auslöser?  Ja  Nein  
a) \_\_\_\_\_
  3. Erste Bildgebung mit V.a. Bronchiolitis obliterans?  Ja  Nein  
a) Wann: \_\_\_\_\_
  4. Letztes CT?  Ja  Nein  
a) Datum: \_\_\_\_\_  
b) Ort: \_\_\_\_\_
  5. Weitere Diagnosen (z.B. Immundefekt, rheumatische Erkrankung, rezidivierende Otitiden, ...)?  Ja  Nein  
a) \_\_\_\_\_  
b) \_\_\_\_\_  
c) \_\_\_\_\_
  6. Bekannte allergische Erkrankung?  Ja  Nein  
a) Seit wann: \_\_\_\_\_
  7. Bekannte Allergie gegen:  
Birke  Ja Gräser  Ja Milbe  Ja Katze  Ja  
Alternaria  Ja andere \_\_\_\_\_
  8. Allergische Rhinokonjunktivitis?  Ja  Nein  
a) Seit wann: \_\_\_\_\_
  9. Atopische Dermatitis?  Ja  Nein  
a) Seit wann: \_\_\_\_\_
  10. Mit Antibiotika behandelte Atemwegsinfekte?  Ja  Nein  
a) Wann der letzte: \_\_\_\_\_  
b) Anzahl in den letzten 12 Monaten: \_\_\_\_\_
  11. Antibiotikaprophylaxe: - mit Zithromax  Ja  Nein  
- andere: \_\_\_\_\_  Ja  Nein
  12. Raucher?  Ja  Nein  
a) Seit wann: \_\_\_\_\_  
b) Anzahl/d: \_\_\_\_\_

Patientennr: |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

13. Regelmäßig eingenommene Medikamente?  Ja  Nein

Jeweils Medikament und Dosis

Steroid inhalativ	_____
Systemisch	_____
Montelukast	_____
beta-Agonist	_____
LAMA	_____
Andere 1	_____



Patientennr: |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

Messung des exhalieren Stickstoffmonoxid (eNO): |\_|\_|\_|\_| ppB

---

1.) Lungenfunktionsprüfung Body: Ja Nein

2.) Lungenfunktionsprüfung (DLCO): Ja Nein

3.) Bronchospasmyse (0,4 mg\_Salbutamol\_) Ja Nein

4.) Lyse Ja Nein

5.) Lung Clearance Index (Multiple Breath Washout) Ja Nein

**6.) Sputuminduktion**

Induktion mit 3% über 7 Minuten  Ja  Nein

Induktion mit 4% über 7 Minuten  Ja  Nein

Induktion mit 5% über 7 Minuten  Ja  Nein

Sputum nach Protokoll aufgearbeitet und Sputumprotokoll im CRF  Ja  Nein

Patientennr: |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

**Einverständniserklärung mit Unterschrift des Patienten  
(ab 8 Jahren)**

Ja  Nein

**Einverständniserklärung mit Unterschrift aller  
Sorgeberechtigten**

Ja  Nein

**Körperliche Untersuchung erfolgt**

Ja  Nein

**Blutentnahme (inkl. miRNA) erfolgt**

Ja  Nein

**Fragebögen ausgefüllt (chILD-EU Baseline / Follow up,  
PRO, BAT)**

Ja  Nein

---

## Studienende

**Hat der Patient die Studie gemäß dem Studienprotokoll beendet?**

Ja  Nein

CRF Kontrollgruppe

Patientencode: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ Datum der Visite: \_\_\_\_\_

Größe: \_\_\_\_\_ cm Gewicht: \_\_\_\_\_ kg BMI: \_\_\_\_\_

Herzfrequenz: \_\_\_\_\_ O<sub>2</sub>-Sättigung: \_\_\_\_\_ % AF: \_\_\_\_\_

Auskultationsbefund Lunge: \_\_\_\_\_

- ( ) Lungenfunktion
- ( ) DLCO
- ( ) eNO: \_\_\_\_\_ ppb
- ( ) Einverständnissbögen vollständig ausgefüllt?
- ( ) BAT-Bogen ausgefüllt?
- ( ) Blutentnahme (1x miRNA, 2x weiß, 1x rot)

## **Patienteninformation und Einverständniserklärung für Eltern**

### **Titel der Studie**

**Rolle der microRNAs in der Pathophysiologie der Bronchiolitis obliterans (BO)**

### **Anrede:**

Sehr geehrte Eltern,  
Ihr Kind leidet an einer Bronchiolitis obliterans und ist nach Meinung Ihres behandelnden Arztes geeignet, an einer Studie teilzunehmen.

### **Zweck der Studie**

Der Zweck dieser Studie ist es, mehr über die sehr seltene Erkrankung Bronchiolitis obliterans (BO) zu lernen. Dazu wollen wir zunächst erfahren, wann und auf welchem Weg die Diagnose bei Ihrem Kind gestellt wurde und wie es Ihrem Kind heute geht. Darüber hinaus wollen wir Ihr Kind gründlich untersuchen, um den Schweregrad der Erkrankung besser zu verstehen. Zudem wird die Rolle der sogenannten „microRNAs“ evaluiert. MicroRNAs sind kleine und vermutlich keine Information tragende Bestandteile unseres Erbguts, die das Ablesen der Gene beeinflussen können. Studien konnten zeigen, dass Veränderungen an diesen microRNAs (miRNA) bei anderen Lungenerkrankungen, wie Asthma, Mukoviszidose oder COPD gefunden werden können. Diese Fragmente dienen dabei nicht als genetischer Fingerabdruck, anhand dessen ein Mensch identifiziert werden kann, sondern eher als Marker für oben genannte Erkrankungen. Während man die Veränderungen z.B. am Blutbild mittlerweile gut erklären kann, ist das Wissen bei den miRNA noch sehr begrenzt, weshalb wir wissen wollen, ob einzelne dieser miRNA bei BO gehäuft oder seltener vorkommen.

### **Freiwilligkeit**

Ihre Teilnahme ist freiwillig. Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Teilnahmebereitschaft widerrufen, ohne dass Ihnen oder Ihrem Kind dadurch irgendwelche Nachteile für Ihre weitere ärztliche Versorgung entstehen.

### **Andere Behandlungsmöglichkeiten**

Zur Behandlung Ihrer Erkrankung stehen therapeutische Optionen zur Verfügung, die wir mit Ihnen besprechen können. Diese können in einigen Fällen eine Besserung oder Linderung ihres Beschwerdebildes bewirken. Das Wissen über die Erkrankung reicht heute jedoch nicht aus, um eine Bronchiolitis obliterans vorzubeugen oder so zu behandeln, dass die Erkrankung bei jedem ohne Folgen abheilen kann. Dazu muss weiter geforscht werden.

Wenn Sie mit Ihrem Kind nicht an der Studie teilnehmen möchten, stehen wir Ihnen zur Behandlung der Erkrankung weiter zur Verfügung.

Für Mädchen, die bereits Ihre Menarche hatten:

Schwangere sollten grundsätzlich **nicht an Studien teilnehmen**. Während der Teilnahme an dieser Studie muss eine zuverlässige Maßnahme zur Schwangerschaftsverhütung angewendet werden, wenn das für Ihr Kind relevant ist. Darüber wird Sie der Studienarzt informieren. Vor Beginn der Studie wird ein Schwangerschaftstest durchgeführt.

Sollte während der Studie eine Schwangerschaft festgestellt werden oder der begründete Verdacht einer Schwangerschaft vorliegen, ist umgehend der Studienarzt zu informieren.

**Ablauf der Studie**

An dieser Studie werden insgesamt ungefähr 80 Personen teilnehmen (60 Patienten mit Bronchiolitis obliterans und 20 Gesunde Kontrollen).

Vor Aufnahme in diese Studie wird die Vorgeschichte Ihrer Krankheit erhoben und Sie werden einer umfassenden ärztlichen Untersuchung unterzogen. Zusätzlich werden Sie gebeten einen standardisierten Fragebogen zur Lebensqualität gemeinsam mit Ihrem Kind auszufüllen.

Dann werden unterschiedliche Lungenfunktionsprüfungen durchgeführt. Es erfolgt eine Blutentnahme um verschiedene Entzündungsmarker, die daran beteiligt sind das Krankheitsbild Bronchiolitis obliterans auszulösen, bei Ihrem Kind zu analysieren. Insgesamt werden Ihrem Kind ca. 20 ml Blut abgenommen. Das Blut wird so lange aufbewahrt bis die Entzündungsmarker im Blut einschließlich der microRNA bestimmt wurden und dann anschließend vernichtet.

Im Anschluss bitten wir Ihr Kind, ansteigende Konzentrationen von NaCl (3% → 4% → 5%) über jeweils sieben Minuten zu inhalieren. Nach jeder Stufe fordern wir Ihr Kind auf, Sputum abzuhusten, damit wir dieses zu Analyse Zwecken auffangen können.

Ihre Teilnahme an dieser Studie wird voraussichtlich zwei Stunden dauern. Die Studie hat nur einen Vorstellungstermin.

**Mögliche Risiken, Beschwerden und Begleiterscheinungen**

Im Rahmen der Abnahme von induziertem Sputum kann es in sehr seltenen Fällen zu einer Atemwegsobstruktion mit Husten bis zur Entwicklung von leichtgradiger Atemnot kommen. Aus diesem Grund wird vorher ein Bronchien erweiterndes Mittel (Salbutamol Dosier-Aerosol, 400 µg = 4Hübe) inhaliert. Darunter treten die Beschwerden nicht auf. Sollte es wider Erwarten trotzdem zu Husten oder Atemnot kommen, wird die Sputuminduktion beendet und ein weiteres Mal mit 200µg Salbutamol behandelt.

Bei einer Blutentnahme können Schmerz, blaue Flecken, Ohnmacht, Schwindel und evtl. Nervenschädigungen auftreten, die ggf. irreversibel mit Dauerschmerzen und Funktionsbeeinträchtigungen verbunden sind.

Bitte teilen Sie Ihrem Arzt *alle* Beschwerden, Erkrankungen oder Verletzungen mit, die im Verlauf der Studie auftreten. Falls Sie sehr beeinträchtigt sind, informieren Sie den Arzt bitte umgehend, ggf. telefonisch. Nur so können wir die erforderlichen Gegenmaßnahmen treffen.

### **Möglicher Nutzen aus Ihrer Teilnahme an der Studie**

Ihr Kind wird durch die Teilnahme an dieser Studie voraussichtlich nicht profitieren. Die Forschungsergebnisse dienen zunächst dazu, die Erkrankung besser zu verstehen.

### **Vorzeitige Beendigung der Studie**

Sie waren eingangs darauf hingewiesen worden, dass die Teilnahme freiwillig ist und dass Sie jederzeit auch ohne Angabe von Gründen Ihre Bereitschaft widerrufen können ohne dass Ihnen oder Ihrem Kind dadurch irgendwelche Nachteile für die weitere ärztliche Versorgung entstehen.

Unter gewissen Umständen ist es auch möglich, dass der Studienarzt entscheidet, Ihre Teilnahme an der Studie vorzeitig zu beenden, ohne vorher Ihr Einverständnis einzuholen. Die Gründe hierfür werden Ihnen bekanntgegeben.

Sofern Sie sich dazu entschließen, vorzeitig aus der Studie auszusteigen, oder Ihre Teilnahme aus oben genannten Gründen vorzeitig beendet wird, ist es für Ihre eigene Sicherheit wichtig, dass Sie sich im Anschluss bei allen auftretenden Schwierigkeiten bei Ihrem Arzt vorstellen.

### **Ansprechpartner**

Wenn Sie Fragen zu dieser Studie haben, wenden Sie sich bitte an:

Name: Dr. med. Martin Rosewich

Goethe Universität  
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Allergologie, Pneumologie und Mukoviszidose

Telefon: 069/630183063

## Einwilligungserklärung

### Titel der Studie

### **Rolle der microRNAs in der Pathophysiologie der Bronchiolitis obliterans (BO)**

Name des *Patienten oder Probanden* in Druckbuchstaben:.....

*Patienten oder Probanden-Nr.*:.....

Wir erklären uns dazu bereit, dass unser Kind an dieser Studie teilnehmen darf.

- Wir sind von Herrn / Frau (Dr. med.) \_\_\_\_\_ ausführlich und verständlich über die Studie, mögliche Belastungen und Risiken sowie über Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie, sowie die sich für und unser Kind daraus ergebenden Anforderungen aufgeklärt worden. Wir haben darüber hinaus den Text der Patientenaufklärung und dieser Einwilligungserklärung gelesen und verstanden. Aufgetretene Fragen wurden uns vom Studienarzt verständlich und ausreichend beantwortet.
- Wir hatten ausreichend Zeit, Fragen zu stellen und uns zu entscheiden.
- Wir werden den ärztlichen Anforderungen, die für die Durchführung der Studie erforderlich sind, Folge leisten, behalten uns jedoch das Recht vor, die freiwillige Mitwirkung jederzeit zu beenden, ohne dass daraus Nachteile entstehen.

### Datenschutz (optisch hervorheben)\*

**Wir sind mit der Aufzeichnung der im Rahmen der Studie an mir erhobenen Krankheitsdaten und ihrer anonymisierten Verwendung, z. B. für Veröffentlichungen einverstanden.\***

Eine Kopie der Patienteninformation und der Einwilligungserklärung haben wir erhalten. Das Original verbleibt beim Studienarzt.

Datum	Ort	Vor- und Nachname der Sorgeberechtigten (in Druckbuchstaben)	Unterschrift
-------	-----	---	--------------

Datum	Ort	Vor- und Nachname der Sorgeberechtigten (in Druckbuchstaben)	Unterschrift
-------	-----	---	--------------

Datum	Ort	Vor- und Nachname des Studienarztes (in Druckbuchstaben)	Unterschrift
-------	-----	---	--------------

### Selbsterklärung alleiniges Sorgerecht

Hiermit bestätige ich, dass ich das alleinige Sorgerecht für den/die o.g. Patienten/in habe.

Datum	Ort	Vor- und Nachname des/der Sorgeberechtigten (in Druckbuchstaben)	Unterschrift
-------	-----	---	--------------

## **Patienteninformation und Einverständniserklärung**

### **Titel der Studie**

#### **Rolle der microRNAs in der Pathophysiologie der Bronchiolitis obliterans (BO)**

**Anrede:** Sehr geehrte/r \_\_\_\_\_,

Sie leiden an einer Bronchiolitis obliterans und sind nach Meinung Ihres behandelnden Arztes geeignet, an einer Studie teilzunehmen.

### **Zweck der Studie**

Der Zweck dieser Studie ist es, mehr über die sehr seltene Erkrankung Bronchiolitis obliterans (BO) zu lernen. Dazu wollen wir zunächst erfahren, wann und auf welchem Weg Ihre Diagnose gestellt wurde und wie es Ihnen heute geht. Darüber hinaus wollen wir sie gründlich untersuchen, um den Schweregrad der Erkrankung besser zu verstehen. Zudem wird die Rolle der sogenannten „microRNAs“ evaluiert. MicroRNAs sind kleine und vermutlich keine Information tragende Bestandteile unseres Erbguts, die das Ablesen der Gene beeinflussen können. Studien konnten zeigen, dass Veränderungen an diesen microRNAs (miRNA) bei anderen Lungenerkrankungen, wie Asthma, Mukoviszidose oder COPD gefunden werden können. Diese Fragmente dienen dabei nicht als genetischer Fingerabdruck, anhand dessen ein Mensch identifiziert werden kann, sondern eher als Marker für oben genannte Erkrankungen. Während man die Veränderungen z.B. am Blutbild mittlerweile gut erklären kann, ist das Wissen bei den miRNA noch sehr begrenzt, weshalb wir wissen wollen, ob einzelne dieser miRNA bei BO gehäuft oder seltener vorkommen.

### **Freiwilligkeit**

Ihre Teilnahme ist freiwillig. Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Teilnahmebereitschaft widerrufen, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile für Ihre weitere ärztliche Versorgung entstehen.

### **Andere Behandlungsmöglichkeiten**

Zur Behandlung Ihrer Erkrankung stehen therapeutische Optionen zur Verfügung, die wir mit Ihnen besprechen können. Diese können in einigen Fällen eine Besserung oder Linderung ihres Beschwerdebildes bewirken. Das Wissen über die Erkrankung reicht heute jedoch nicht aus, um eine Bronchiolitis obliterans vorzubeugen oder so zu behandeln, dass die Erkrankung ohne Folgen abheilen kann. Dazu muss weiter geforscht werden.

Wenn Sie nicht an der Studie teilnehmen möchten, stehen wir Ihnen zur Behandlung Ihrer Erkrankung weiter für die halbjährlichen Verlaufsuntersuchungen zur Verfügung.

Schwangere sollten grundsätzlich **nicht an Studien teilnehmen**. Während der Teilnahme an dieser Studie muss eine zuverlässige Maßnahme zur Schwangerschaftsverhütung angewendet werden. Darüber wird Sie der Studienarzt informieren. Vor Beginn der Studie wird ein Schwangerschaftstest durchgeführt.

Sollte während der Studie eine Schwangerschaft festgestellt werden oder der begründete Verdacht einer Schwangerschaft vorliegen, ist umgehend der Studienarzt zu informieren.

### **Ablauf der Studie**

An dieser Studie werden insgesamt ungefähr 80 Personen teilnehmen (60 Patienten mit Bronchiolitis obliterans und 20 Gesunde Kontrollen).

Vor Aufnahme in diese Studie wird die Vorgeschichte Ihrer Krankheit erhoben und Sie werden einer umfassenden ärztlichen Untersuchung unterzogen. Zusätzlich werden Sie gebeten einen standardisierten Fragebogen zur Lebensqualität gemeinsam mit Ihrem Kind auszufüllen.

Dann werden unterschiedliche Lungenfunktionsprüfungen durchgeführt. Es erfolgt eine Blutentnahme um verschiedene Entzündungsmarker, die daran beteiligt sind das Krankheitsbild Bronchiolitis obliterans auszulösen, bei Ihnen zu analysieren. Insgesamt werden Ihnen ca. 30 ml Blut abgenommen. Das Blut wird so lange aufbewahrt bis die Entzündungsmarker im Blut einschließlich der MicroRNA bestimmt wurden und dann anschließend vernichtet.

Im Anschluß bitten wir Sie, ansteigende Konzentrationen von NaCl (3% → 4% → 5%) über jeweils sieben Minuten zu inhalieren. Nach jeder Stufe fordern wir Sie auf, Sputum abzuhusten, damit wir dieses zu Analysezwecken auffangen können.

Ihre Teilnahme an dieser Studie wird voraussichtlich zwei Stunden dauern. Die Studie hat nur einen Vorstellungstermin.

### **Mögliche Risiken, Beschwerden und Begleiterscheinungen**

Im Rahmen der Abnahme von induziertem Sputum kann es in sehr seltenen Fällen zu einer Atemwegsobstruktion mit Husten bis zur Entwicklung von leichtgradiger Atemnot kommen. Aus diesem Grund wird vorher ein Bronchien erweiterndes Mittel (Salbutamol Dosier-Aerosol, 400 µg = 4Hübe) inhaliert. Darunter treten die Beschwerden nicht auf. Sollte es wider Erwarten trotzdem zu Husten oder Atemnot kommen, wird die Sputuminduktion beendet und ein weiteres Mal mit 200µg Salbutamol behandelt.

Bei einer Blutentnahme können Schmerz, blaue Flecken, Ohnmacht, Schwindel und evtl. Nervenschädigungen auftreten, die ggf. irreversibel mit Dauerschmerzen und Funktionsbeeinträchtigungen verbunden sind.

Bitte teilen Sie Ihrem Arzt *alle* Beschwerden, Erkrankungen oder Verletzungen mit, die im Verlauf der Studie auftreten. Falls Sie sehr beeinträchtigt sind, informieren Sie den Arzt bitte umgehend, ggf. telefonisch. Nur so können wir die erforderlichen Gegenmaßnahmen treffen.

### **Möglicher Nutzen aus Ihrer Teilnahme an der Studie**

Sie werden durch die Teilnahme an dieser Studie voraussichtlich nicht direkt profitieren. Die Forschungsergebnisse dienen zunächst dazu, die Erkrankung besser zu verstehen und in Zukunft möglicherweise behandelbar zu machen.

### **Vorzeitige Beendigung der Studie**

Sie waren eingangs darauf hingewiesen worden, dass Ihre Teilnahme freiwillig ist und dass Sie jederzeit auch ohne Angabe von Gründen Ihre Bereitschaft widerrufen können ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile für Ihre ärztliche Versorgung entstehen.

Unter gewissen Umständen ist es auch möglich, dass ich als Ihr Arzt entscheide, Ihre Teilnahme an der Studie vorzeitig zu beenden, ohne vorher Ihr Einverständnis einzuholen. Die Gründe hierfür werden Ihnen bekanntgegeben.

Sofern Sie sich dazu entschließen, vorzeitig aus der Studie auszusteigen, oder Ihre Teilnahme aus oben genannten Gründen vorzeitig beendet wird, ist es für Ihre eigene Sicherheit wichtig, dass Sie sich weiterhin der jährlichen Verlaufsuntersuchungen in der Ambulanz unterziehen.

### **Ansprechpartner**

Wenn Sie Fragen zu dieser Studie haben, wenden Sie sich bitte an:

Name: Dr. med. Martin Rosewich

Goethe Universität  
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Allergologie, Pneumologie und Mukoviszidose

Telefon: 069/630183063

## Einwilligungserklärung

*Titel der Studie*

### **Rolle der microRNAs in der Pathophysiologie der Bronchiolitis obliterans (BO)**

Name des *Patienten oder Probanden* in Druckbuchstaben:.....

*Patienten oder Probanden-Nr.*:.....

Ich erkläre mich bereit, an der Studie teilzunehmen.

§ Ich bin von Herrn / Frau (Dr. med.) \_\_\_\_\_ ausführlich und verständlich über die Studie, mögliche Belastungen und Risiken sowie über Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie, sowie die sich für mich daraus ergebenden Anforderungen aufgeklärt worden. Ich habe darüber hinaus den Text der Patientenaufklärung und dieser Einwilligungserklärung gelesen und verstanden. Aufgetretene Fragen wurden mir vom Studienarzt verständlich und ausreichend beantwortet.

§ Ich hatte ausreichend Zeit, Fragen zu stellen und mich zu entscheiden.

§ Ich werde den ärztlichen Anforderungen, die für die Durchführung der Studie erforderlich sind, Folge leisten, behalte mir jedoch das Recht vor, meine freiwillige Mitwirkung jederzeit zu beenden, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

#### **Datenschutz (optisch hervorheben)\***

**Ich bin mit der Aufzeichnung der im Rahmen der Studie an mir erhobenen Krankheitsdaten und ihrer anonymisierten Verwendung, z. B. für Veröffentlichungen einverstanden.\***

Eine Kopie der Patienteninformation und der Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt beim Studienarzt.

---

Datum	Ort	Vor- und Nachname des Patienten / Probanden (in Druckbuchstaben)	Unterschrift
-------	-----	--	--------------

---

Datum	Ort	Vor- und Nachname des Studienarztes (in Druckbuchstaben)	Unterschrift
-------	-----	--	--------------

## Information und Einwilligung für Kinder und Jugendliche

---

**Prüfstelle:** Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Allergologie, Pneumologie und Mukoviszidose, Goethe-Universität, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt/M, Tel.: +49 69-6301-5732

**Prüfarzt:** Dr. med. Martin Rosewich

### **Rolle der microRNAs in der Pathophysiologie der Bronchiolitis obliterans (BO)**

Liebe / r ...,

wir möchten Dich fragen, ob Du bereit bist, an der hier beschriebenen klinischen Prüfung (Studie) teilzunehmen.

Solche Studien dienen der Forschung in der Medizin. Sie sind notwendig, um genauer herauszufinden, wie man Deine Erkrankung besser erkennen kann. In dieser Studie werden keine Medikamente getestet. Diese Studie wird in Frankfurt/M, Hannover, Düsseldorf und in Barcelona in Spanien durchgeführt. Es sollen insgesamt ungefähr 80 Kinder, Jugendliche und Erwachsene daran teilnehmen.

Ob Du bei der Studie mitmachen möchtest, kannst Du zusammen mit Deinen Eltern selbst entscheiden. Deine Teilnahme ist, auch wenn Deine Eltern zustimmen, freiwillig; keiner zwingt Dich. Wenn Du nicht an der Studie teilnehmen oder später aus ihr ausscheiden möchtest, entstehen Dir daraus keine Nachteile.

Ob Du mitmachen willst, musst Du nicht gleich entscheiden; lass Dir ruhig einige Tage Zeit um darüber nachzudenken. Diese Information soll Dir bei Deiner Entscheidung helfen, denn es ist wichtig, dass Du alles verstehst. Auch Deine Eltern haben von uns eine schriftliche Information bekommen. Wenn Ihr alles gelesen habt, werdet Ihr Euch darüber unterhalten. Deine Eltern werden sicher die meisten Fragen, die Du hast, beantworten können. Und Dein Arzt wird wegen dieser Studie auch alles mit Dir besprechen. Er wird genügend Zeit haben, Deine Fragen zu beantworten.

#### **1. Warum wird diese Studie durchgeführt?**

Über Deine sehr seltene Erkrankung mit dem Namen Bronchiolitis obliterans ist bisher noch nicht genug bekannt. Deshalb wollen wir mehr über Deine Erkrankung erfahren. Dazu müssen wir herausfinden, seit wann Du krank bist und welche Untersuchungen und Behandlungen bisher erfolgt sind. Wir werden Dich gründlich untersuchen.

## **2. Wie ist der Ablauf der Studie und was muss ich bei Teilnahme beachten?**

Vor Aufnahme in diese Studie wird die Vorgeschichte Deiner Krankheit erhoben und Du wirst umfassend ärztlich untersucht. Zusätzlich musst Du zusammen mit Deinen Eltern einen Fragebogen ausfüllen, damit wir wissen, wie es Dir mit Deiner Erkrankung geht. Weiter werden wir bei Dir Lungenfunktionstests, eine körperliche Untersuchung sowie eine Blutentnahme durchführen. Außerdem üben wir mit Dir, wie man den Schleim aus Deiner Lunge gut abhusten kann.

Bei Teilnahme an der Studie vereinbaren wir mit Dir und Deinen Eltern gemeinsam einen Termin, an dem du in die Ambulanz kommst. Gerne kannst du deine Eltern zu diesem Termin mitbringen. Die verschiedenen Untersuchungen werden ungefähr zwei Stunden dauern.

## **3. Welchen persönlichen Nutzen habe ich von der Teilnahme an der Studie?**

Du wirst durch die Teilnahme an dieser Studie nicht profitieren. Die Forschungsergebnisse dienen dazu, die Erkrankung besser zu verstehen.

## **4. Welche Risiken sind mit der Teilnahme an der Studie verbunden?**

Im Rahmen der Abnahme von induziertem Sputum kann es in sehr seltenen Fällen zu einer Atemwegsverengung mit Husten und Pfeifen und leichtgradiger Atemnot kommen. Damit das nicht passiert, geben wir Dir vorher ein schützendes Mittel (Salbutamol Dosier-Aerosol, 400 µg = 4Hübe) zum inhalieren. Darunter treten die Beschwerden nicht auf. Sollte es wider Erwarten trotzdem zu Husten oder Pfeifen kommen, hören wir auf und geben dir noch einmal das schützende Mittel.

Bei einer Blutentnahme können Schmerz, blaue Flecken, Ohnmacht, Schwindel und evtl. Nervenschädigungen auftreten, die ggf. unumkehrbar mit Dauerschmerzen und Funktionsbeeinträchtigungen verbunden sind.

Bitte teile Deinem Arzt *alle* Beschwerden, Erkrankungen oder Verletzungen mit, die im Verlauf der Studie auftreten. Falls sie Dich sehr beeinträchtigen, informiere den Arzt bitte umgehend, ggf. telefonisch. Nur so können wir die erforderlichen Gegenmaßnahmen treffen.

## **5. Welche anderen Behandlungsmöglichkeiten gibt es außerhalb der Studie?**

Wenn Du nicht an der Studie teilnehmen möchtest, stehen wir Dir zur Behandlung Deiner Erkrankung weiter für die jährlichen Verlaufsuntersuchungen zur Verfügung.

## 6. Wer darf an dieser Studie nicht teilnehmen?

Du darfst nicht teilnehmen, wenn Du gleichzeitig an anderen Studien teilnimmst.

Solltest Du **schwanger** sein oder vorhaben während dieser Studie schwanger zu werden, darfst Du nicht an dieser Studie teilnehmen.

Zu Beginn der Studie müssen sich deshalb alle Mädchen einem Schwangerschaftstest unterziehen. Durch einen Schwangerschaftstest kann jedoch eine Schwangerschaft erst einige Tage nach der Empfängnis verlässlich nachgewiesen werden.

Im Falle Deiner Teilnahme an dieser Studie musst Du daher zuverlässige Maßnahmen zur Schwangerschaftsverhütung anwenden. Diese sind:

- Depotpräparate wie z.B. Dreimonatsspritze oder Hormonimplantat
- Intrauterinpressare /-systeme wie z.B. Kupferspirale oder Hormonspirale
- Klassische Pille oder Minipille
- Sterilisation der Frau oder des Mannes
- Sexuelle Abstinenz (Enthaltbarkeit)

## 7. Wer entscheidet, ob ich aus der Studie ausscheide?

Du kannst jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Deine Teilnahme an der Studie beenden, ohne dass Dir dadurch irgendwelche Nachteile bei Deiner medizinischen Behandlung entstehen.

Unter gewissen Umständen ist es aber auch möglich, dass Deine Teilnahme aus anderen Gründen beendet werden muss. Dies wird Dir im Einzelfall durch Deinen Studienarzt mitgeteilt.

## 8. Was geschieht mit meinen Daten?

Während der Studie werden Angaben über Dich und Deine Krankheit aufgeschrieben und elektronisch gespeichert. Sie werden an der Universitätsklinik in Frankfurt ausgewertet. Dein Name wird dort aber nicht angegeben, damit nicht jeder etwas über Dich und Deine Krankheit erfährt. Bestimmte Personen, z.B. Studienmitarbeiter, dürfen aber, vor allem wenn es zu Deinem Schutz geboten erscheint, auch Deinen Namen erfahren und in die Unterlagen Einblick nehmen.

Wenn Du Deine Teilnahme an der Studie beenden möchtest, müssen die bereits gespeicherten Angaben über Dich und Deine Krankheit weiter gespeichert bleiben.

Nähere Informationen dazu haben Deine Eltern erhalten.

### **9. Was geschieht mit meinen Blutproben / Gewebeproben?**

Die Blutproben / Gewebeproben werden nach Abschluss der Studie in folgender Weise aufbewahrt:

- Pneumologisch-Immunologisches Labor (PIL) - Prof. Dr. R. Schubert Tel.: 069/6301-83611 ralf.schubert@kgu.de
- <http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Child-EU/en/register/biobank/index.html>

### **10. An wen wende ich mich bei weiteren Fragen?**

#### **Beratungsgespräche an der Prüfstelle**

Du hast jederzeit die Gelegenheit zu weiteren Beratungsgesprächen mit dem auf Seite 1 genannten oder einem anderen Studienarzt.

### Einwilligungserklärung

Voraussetzung für Deine Teilnahme ist, dass Du einverstanden bist. Wenn ja, bitten wir Dich, auf diesem Blatt zu unterschreiben. Du bestätigst uns damit, dass Du an der Studie teilnehmen möchtest und weißt, dass dies freiwillig ist, alle Deine Fragen zu Deiner Zufriedenheit beantwortet wurden und Du genügend Zeit hattest, Deine Teilnahme zu bedenken. Du kannst aber auch später zu jeder Zeit sagen, dass Du nicht mehr an der Studie teilnehmen möchtest. Du wirst deshalb auch keine Nachteile für Deine medizinische Behandlung haben.

Ich erkläre mich freiwillig bereit, an der oben genannten Studie teilzunehmen.

**Mit der Erhebung und Verwendung meiner Daten wie in der mir ausgehändigten Informationsschrift beschrieben bin ich einverstanden.**

---

Datum	Ort	Name des Patienten/Probanden (in Druckbuchstaben)	Unterschrift
-------	-----	--	--------------

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Jugendlichen eingeholt. Ich habe mich davon überzeugt, dass der Jugendliche alles verstanden hat, keine weiteren Fragen mehr hat und seiner Teilnahme zustimmt.

---

Datum	Ort	Name des aufklärenden Prüfarztes (in Druckbuchstaben)	Unterschrift
-------	-----	--	--------------

## 9. Danksagung

## 10. Lebenslauf

## 11. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **Rolle der microRNAs in der Pathophysiologie der Bronchiolitis obliterans**

in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Schwerpunkt Allergologie, Pneumologie und Mukoviszidose unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. Martin Rosewich mit Unterstützung durch Prof. Dr. Stefan Zielen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Duecker RP, De Mir Messa I, Jerkic S, Kochems A, Gottwald G, Moreno A, Rosewich M, Gronau L, Zielen S, Chiocchetti AG, Kreyenberg H, Schubert R  
Epigenetic regulation of inflammation by microRNAs in post-infectious bronchiolitis, *Clinical & Translational Immunology Journal*, Band 2, Seite e1376, 2022

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)