

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

betreut am
Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik 4 (Nephrologie)
Kommissarische Leiterin: Prof. Dr. med. Ingeborg A. Hauser

**Untersuchung von long non-coding RNA im Entzündungsmodell mit
mesenchymalen Stamm-/Stromazellen**

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

vorgelegt von
Dennis Sebastian Weck

aus Solingen

Frankfurt am Main, 2022

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

Referent: Prof. Dr. Patrick C. Baer

Korreferent: Prof. Dr. Reinier A. Boon

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Entzündung.....	1
1.2 Pattern-recognition-Rezeptoren.....	2
1.2.1 Toll-like Rezeptoren.....	2
1.2.2 TLR-Signalwege.....	3
1.3 Long non-coding RNA als Regulator der Genexpression.....	5
1.4 Mesenchymale Stamm-/Stromazellen.....	7
1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	9
2 Material.....	10
3 Methoden.....	19
3.1 Zellkultur.....	19
3.1.1 Zellisolation.....	19
3.1.2 Kultivierung der Zellen.....	20
3.2 Zellstimulation.....	21
3.2.1 Stimulation mit bakteriellen Toxinen.....	21
3.2.2 Transfektion.....	22
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	22
3.3.1 RNA-Extraktion.....	22
3.3.2 Reverse Transkription.....	23
3.3.3 Real-time qPCR.....	24
3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	26
3.3.5 Messung der RNA-Integrität.....	27
3.3.6 Depletion ribosomaler RNA.....	27
3.3.7 Erstellung der Bibliotheken für die RNA-Sequenzierung.....	29
3.3.8 RNA-Sequenzierung.....	32
3.4 Immunologische Analysemethoden.....	33
3.4.1 IL-6-ELISA.....	33
4 Ergebnisse.....	35
4.1 Ergebnisse der Zellstimulation.....	35
4.1.1 Vergleich verschiedener Toxine und Zelltypen.....	35
4.1.2 Vergleich verschiedener Stimulationszeiten.....	36
4.1.3 Vergleich verschiedener Toxin-Konzentrationen.....	38
4.1.4 Vergleich verschiedener Marker mittels qPCR.....	40
4.1.5 Vergleich verschiedener Zellisolationen.....	41
4.2 RNA-Sequenzierung.....	42
4.2.1 Codierende Transkripte.....	42
4.2.2 Nicht-codierende Transkripte.....	46
4.2.2.1 H19-202.....	47
4.2.2.2 H19-203.....	48
4.2.2.3 NEAT1-202.....	49
4.2.2.4 TGFB2-OT1-201.....	50
4.2.2.5 AC037198.1-201.....	51

4.2.2.6 LINC00607-205.....	52
4.3 Ergebnisse der Transfektion.....	53
4.3.1 IL-6.....	53
4.3.2 H19-202.....	56
4.3.3 H19-203.....	57
4.3.4 NEAT1-202.....	58
5 Diskussion.....	60
5.1 Zellstimulation.....	60
5.2 RNA-Sequenzierung.....	64
5.2.1 Codierende Transkripte.....	65
5.2.2 Nicht-codierende Transkripte.....	68
5.3 Transfektion.....	70
5.4 Conclusio.....	74
6 Zusammenfassung.....	75
7 Abstract.....	77
Anhang.....	79
Schriftliche Erklärung.....	85
Lebenslauf.....	86
Danksagung.....	87
Literaturverzeichnis.....	88

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ANOVA	analysis of variance
ASC	Adipose-derived stem/stromal cells (Stamm-/Stromazellen aus Fettgewebe)
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
c	Konzentration
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ciPTC	Konditionell immortalisierte proximale Tubuluszellen
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CT	Cycle threshold
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fetales Kälberserum
FENDRR	Forkhead box protein F1 adjacent non-coding developmental regulatory RNA
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
GO	Gene Ontology
GSEA	Gene set enrichment analysis
h	Stunden
HITS-CLIP	high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation

HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IL-6	Interleukin-6
IRF3	Interferon regulierender Faktor 3
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
lncRNA	long non-coding RNA (lange nicht-codierende RNA)
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
LUCAT1	lung cancer associated transcript 1
MAL	MyD88-adaptor-like
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MD-1	Myeloid Differenzierungsfaktor 1
MD-2	Myeloid Differenzierungsfaktor 2
MIAT	myocardial infarction associated transcript
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
MSC	Mesenchymale Stamm-/Stromazellen
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
PAMP	pathogen-associated molecular patterns (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCAT-1	prostate cancer-associated transcript 1

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
pg	Pikogramm
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptor
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonukleinsäure
ROR2	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
RPM	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RQ	Relative Quantifikation
RT	Reverse Transkription
SARM	sterile α - and armadillo-motif-containing protein
SD	standard deviation
sec	Sekunden
SIGIRR	single immunoglobulin and toll-interleukin 1 related receptor
siRNA	small interfering RNA
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TIR	Toll-interleukin-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein including Interferon- β
V	Volt
Xist	X-inactive specific transcript
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: qPCR nach Inkubation von ASC mit unterschiedlichen Toxinen.....	35
Abb. 2: qPCR nach Inkubation von ciPTC mit unterschiedlichen Toxinen.....	36
Abb. 3: qPCR bei unterschiedlicher Inkubationsdauer.....	37
Abb. 4: IL-6-ELISA bei unterschiedlicher Inkubationsdauer.....	37
Abb. 5: qPCR mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen.....	38
Abb. 6: IL-6-ELISA mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen.....	39
Abb. 7: qPCR mit unterschiedlichen Markern.....	40
Abb. 8: qPCR mit unterschiedlichen Zellisolationen.....	41
Abb. 9: Volcano plots der KEGG-Terme.....	43
Abb. 10: Volcano plots der GO-Terme biologischer Prozesse.....	44
Abb. 11: Volcano plots der GO-Terme molekularer Funktionen.....	45
Abb. 12: qPCR nach LPS-Stimulation von ASC für WNT2, WNT5A, ROR2, FZD2 und FZD7.....	46
Abb. 13: qPCR nach LPS-Stimulation von ASC für das Transkript H19-202.....	47
Abb. 14: qPCR nach LPS-Stimulation von ASC für das Transkript H19-203.....	48
Abb. 15: qPCR nach LPS-Stimulation von ASC für das Transkript NEAT1-202.....	49
Abb. 16: qPCR nach LPS-Stimulation von ASC für das Transkript TGFB2-OT1-201..	50
Abb. 17: qPCR nach LPS-Stimulation von ASC für das Transkript AC037198.1-201...	51
Abb. 18: qPCR nach LPS-Stimulation von ASC für das Transkript LINC00607-205....	52
Abb. 19: qPCR der Transfektionsversuche für den Marker IL-6.....	54
Abb. 20: IL-6-ELISA der Transfektionsversuche.....	55
Abb. 21: qPCR der Transfektionsversuche für das Transkript H19-202.....	56
Abb. 22: qPCR der Transfektionsversuche für das Transkript H19-203.....	57
Abb. 23: qPCR der Transfektionsversuche für das Transkript NEAT1-202.....	59

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräte.....	10
Tab. 2: Software und Datenbanken.....	11
Tab. 3: Verbrauchsmaterial.....	12
Tab. 4: Chemikalien.....	13
Tab. 5: Konditionell immortalisierte Zellen, Zellkulturmedien und Mediensupplemente	14
Tab. 6: Proteine, Enzyme und bakterielle Toxine.....	15
Tab. 7: Material für molekularbiologische Analysen.....	15
Tab. 8: Primer für codierende Transkripte.....	16
Tab. 9: Primer für nicht-codierende Transkripte.....	17
Tab. 10: siRNA.....	18
Tab. 11: Nährmedium für ASC.....	20
Tab. 12: Nährmedium für ciPTC.....	20
Tab. 13: RT-Reaktionspuffer (passend für eine Probe).....	24
Tab. 14: Real-time qPCR-Reaktionspuffer (passend für eine Probe).....	24
Tab. 15: Inkubationszyklus real-time qPCR.....	25
Tab. 16: Inkubationszyklus Depletion ribosomaler RNA.....	28
Tab. 17: RNase H Master-Mix (passend für eine Probe).....	28
Tab. 18: DNase I Master-Mix (passend für eine Probe).....	29
Tab. 19: Master-Mix für die Synthese des ersten Strangs (passend für eine Probe).....	30
Tab. 20: Inkubationsschema DNA-Synthese.....	30
Tab. 21: Master-Mix für die Synthese des zweiten Strangs (passend für eine Probe)....	30
Tab. 22: PCR-Mix zur Amplifikation der Bibliotheken.....	32
Tab. 23: Inkubationszyklus Amplifikation der Bibliotheken.....	32

1 Einleitung

1.1 Entzündung

Die Entzündung ist eine Abwehrreaktion des Körpers auf schädigende Einflüsse, an der Blutgefäße, Blutzellen und -plasmabestandteile sowie das Bindegewebe beteiligt sind.¹ Das Ziel der akuten Entzündungsreaktion ist eine Elimination des auslösenden Faktors sowie eine Induktion der Geweberegeneration, die bereits bei Auslösung der Entzündung gebahnt wird.^{2,3} Bei Persistenz der auslösenden Faktoren oder einer Dysregulation des Entzündungsprozesses kann es zu chronischen Entzündungen kommen.²

Sowohl exogene als auch endogene Faktoren können eine Entzündung auslösen. Zu den exogenen Faktoren zählen Mikroorganismen und chemisch-physikalische Noxen wie etwa Allergene, Toxine, anorganische Stoffe, Hitze, Kälte oder ionisierende Strahlung.^{1,2} Zu den endogenen Faktoren der Entzündung gehören unter anderem Moleküle, die im Rahmen von Stress, Dysfunktion oder Zerfall von Zellen oder Gewebe freigesetzt werden und physiologisch nicht extrazellulär auftreten.^{2,4} Darüber hinaus können Stoffwechselprodukte wie Natriumurat oder oxidierte Lipoproteine endogene Auslöser von Entzündungen und infolge dessen von Erkrankungen, in diesen Fällen Gicht bzw. Atherosklerose, sein.^{5,6} Entsprechend sind Entzündungsprozesse relevant bei einem breiten Spektrum akuter und chronischer Erkrankungen.

Die Auslösung einer Entzündung durch Mikroorganismen ist besonders gut untersucht und verstanden. Sie werden zum einen erkannt durch die Folgen ihrer schädlichen Wirkung auf Zellen und Gewebe. Dazu gehört unter anderem die Freisetzung von immun-aktivierenden Peptiden und Proteinen im Rahmen des Zelluntergangs, den sogenannten Alarminen.⁷ Zum anderen erfolgt die Detektion durch pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP). Dies sind molekulare Strukturen, die typisch sind für eine bestimmte Spezies von Mikroorganis-

men.⁸ PAMPs und Alarmine werden erkannt durch Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR).^{8,9}

1.2 Pattern-recognition-Rezeptoren

Zu den PRR gehören verschiedene Rezeptor-Klassen: Die membrangebundenen Toll-like Rezeptoren (TLR) und C-Type Lectin Rezeptoren sowie die im Zytoplasma gelegenen RIG-I-like Rezeptoren, NOD-like Rezeptoren und DNA-Rezeptoren.^{8,10} PRRs werden von Zellen des angeborenen Immunsystems wie etwa Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritische Zellen exprimiert.⁸ Aber auch bei anderen Zellen, die keine klassischen Mitglieder des angeborenen Immunsystems sind wie etwa Adipocyten¹¹ und renalen Epithelzellen¹², konnten bereits PRR nachgewiesen werden. Die Aktivierung der PRR durch ihre Liganden führt zur Expressionssteigerung von proinflammatorischen Zytokinen.⁸ Die einzelnen Rezeptoren führen dabei zu unterschiedlichen Mustern veränderter Genaktivität.⁸

1.2.1 Toll-like Rezeptoren

Bisher wurden 10 verschiedene funktionelle Toll-like Rezeptoren beim Menschen und 12 verschiedene bei Mäusen identifiziert. TLR11, TLR12 und TLR13 sind nicht Teil des menschlichen Genoms, TLR 10 ist bei Mäusen aufgrund der Insertion eines Retrovirus nicht funktionell.¹³ Toll-like Rezeptoren sind membrangebundene Rezeptoren und werden exprimiert von Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, dendritischen Zellen und Lymphozyten, aber auch von Zellen, die nicht Teil des Immunsystems sind, wie Fibroblasten oder Epithelzellen.¹⁴ Man kann sie nach ihrer Lokalisation in der Zelle einteilen in zwei Gruppen: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 befinden sich auf der Zellober-

fläche, TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 finden sich in den Membranen intrazellulärer Strukturen wie Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen.¹³

Zu den Liganden der Toll-like Rezeptoren zählt ein breites Spektrum an PAMPs von verschiedensten Mikroorganismen. Bakterien können unter anderem durch Bestandteile ihrer Zellwänden und -membranen¹⁵ wie Lipopolysaccharide (LPS), Lipoteichonsäuren, Lipoproteine und Peptidoglykanen sowie anhand ihrer Nukleinsäuren¹⁶ erkannt werden, Viren durch ihre Nukleinsäuren und Glykoproteine¹⁷. Auch Strukturen von Mykobakterien¹⁸, Pilzen¹⁹ und Protozoen²⁰ können durch Toll-like Rezeptoren erkannt werden. Ein einzelner Rezeptor ist dabei mitnichten limitiert auf die Erkennung eines einzelnen PAMP. So kann beispielsweise TLR4 Paclitaxel, LPS, Fibronectin, Fusionsproteine des respiratorischen Synzytial-Virus und Alarmine wie Hitzeschockproteine erkennen.¹⁴

An der Bindung eines Liganden ist nicht immer nur ein einzelner Rezeptor beteiligt. So werden zur Erkennung einiger PAMPs akzessorische Moleküle benötigt. LPS etwa wird durch TLR4 nur erkannt, wenn es im Komplex mit dem Myeloid-Differenzierungsfaktor 2 (MD-2) ist.²¹ Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass bei einem knockout von MD-2 keine Reaktion auf LPS mehr nachweisbar war.²² Nach Bindung ihres Liganden kommt es zur Dimerisierung der Toll-like Rezeptoren untereinander entweder als Homo- oder Heterodimere.^{23,24}

1.2.2 TLR-Signalwege

Die intrazelluläre Domäne der Toll-like Rezeptoren ist homolog zu der des Interleukin-1-Rezeptors und wird daher Toll-interleukin-1-Rezeptor (TIR) genannt.²⁵ Auch wenn TIR-Domänen der verschiedenen Toll-like Rezeptoren homolog sind, konnte gezeigt werden, dass sie funktionell unterschiedlich sind hinsichtlich der Signalkaskaden, die sie anstoßen.²⁶ Toll-interleukin-1-Rezeptoren kommen zudem an Adapter-Molekülen vor, die intrazellulär an TLR-Dime-

re binden und die weiteren Signalkaskaden vermitteln.²⁷ Bisher wurden fünf solcher Adapter entdeckt: Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), MyD88-adaptor-like (MAL), TIR-domain-containing adaptor protein including Interferon β (TRIF), TRIF-related adaptor molecule (TRAM) und sterile α - and armadillo-motif-containing protein (SARM).²⁸ SARM scheint jedoch eher an der Regulation der Signalkaskaden und weniger an der Signalvermittlung selbst beteiligt zu sein.²⁹

Insgesamt kann man zwei wichtige Signalwege unterscheiden: Den MyD88-abhängigen und den TRIF-abhängigen Signalweg. Ersterer wird von allen Toll-like Rezeptoren außer TLR3 genutzt.³⁰ TLR2 und TLR4 benötigen zur Aktivierung des MyD88-abhängigen Signalwegs zudem MAL.^{31,32} Am Ende des Signalwegs stehen die Aktivierung der mitogen-activated Protein-Kinase (MAPK) sowie des Transkriptionsfaktors NF- κ B.¹⁴ Der TRIF-abhängige Signalweg wird durch TLR3 und TLR4 aktiviert.³³ TLR4 benötigt dabei TRAM zur Aktivierung des TRIF-abhängigen Signalwegs.³⁴ Am Ende dieses Signalwegs stehen die Aktivierung von MAPK sowie der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF3.^{35,36} TLR4 kann also alle vier Adapter-Moleküle rekrutieren. Beide Signalwege sind komplex und über die hier erwähnten Moleküle hinaus sind viele weitere an der Vermittlung der Signale beteiligt.

NF- κ B umfasst Homo- und Heterodimere aus den Transkriptionsfaktoren p50, p52, RelA, RelB und c-Rel.³⁷ NF- κ B ist einer der zentralen Regulatoren des Immunsystems und beeinflusst die Hämatopoese, Entwicklung, Reifung und Apoptose von Immunzellen, die Bildung von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, Zytokinen und Defensinen sowie vielen weiteren Molekülen, die relevant im Rahmen von Entzündungsprozessen sind.³⁸ MAPK sind Proteinkinasen und beteiligt an der Regulation von Differenzierung, Proliferation und Apoptose.³⁹

1.3 Long non-coding RNA als Regulator der Genexpression

In verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen wurden lncRNAs als neuer, wichtiger Regulator der Genexpression identifiziert. lncRNA wurde ursprünglich definiert als RNA, die nicht länger als 200 Nukleotide ist und nicht zu Proteinen translatiert wird.⁴⁰ Daher wurde vermutet, dass sie lediglich transkriptionelles Rauschen sind.⁴¹ Aber die Beteiligung von lncRNA wurde etwa bei der Embryogenese und Organdifferenzierung nachgewiesen. So ist die lncRNA Xist beteiligt an der Inaktivierung von X-Chromosomen durch genetische Prägung.⁴² An der kardiovaskulären Entwicklung ist die lncRNA Fendrr beteiligt.⁴³ Für beide lncRNAs konnte gezeigt werden, dass eine Deletion zum Tod des Embryos führen kann.^{43,44}

Allgemein vermitteln lncRNAs ihre Wirkung durch Interaktion mit DNA, RNA und Proteinen entweder durch sequenzspezifische Hybridisierung oder durch sekundäre und tertiäre Strukturen.⁴⁵ Über diese Mechanismen haben lncRNAs Einfluss auf Epigenetik, Transkription und posttranskriptionelle Regulation.⁴⁶

Im Bereich der epigenetischen Regulation wurde lncRNA beobachtet, die als Bindungsstelle für Histon-modifizierende Proteinkomplexe dient.⁴⁷ Die etwa 180 Basenpaare lange RNA B2, also keine lncRNA im klassischen Sinne, kann die Transkription von mRNA durch direkte Inhibition der RNA-Polymerase II beeinflussen.⁴⁸ Durch Veränderung der Stabilität und Einfluss auf das Spleißen von Transkripten können lncRNAs posttranskriptionell regulatorisch wirken.^{49,50} Zudem wurden auch indirekte Regulationen durch Bindung regulierender micro-RNA beobachtet.⁵¹

Eine Dysregulation von lncRNA wurde besonders bei malignen Erkrankungen beobachtet, was auch Rückschlüsse auf weitere mögliche physiologische Funktionen erlaubt. Bei Prostatakarzinomen wurde der Einfluss der lncRNA PCAT-1 auf die Zellproliferation beschrieben.⁵² MALAT1 ist relevant für Metastasie-

rungsprozesse, indem es Einfluss auf die Expression von Bestandteilen des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix nimmt.⁵³ Zudem konnte auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer⁵⁴ oder Chorea Huntington⁵⁵ sowie bei kardiovaskulären Erkrankungen⁵⁶ eine Relevanz von lncRNAs gezeigt werden. Daher besteht die Hoffnung, sie als diagnostische und therapeutische Ziele zu nutzen.

In *in vivo* Modellen von Inflammation konnte die Bedeutung von lncRNA bereits gezeigt werden. In einem LPS-induzierten Pneumonie-Modell bei Mäusen konnten Liu et al. zeigen, dass die lncRNA myocardial infarction associated transcript (MIAT) in ihrer Expression in Lungengewebe unter LPS-Stimulation deutlich gesteigert war.⁵⁷ Ein knockdown von MIAT führte zu einer signifikant geringeren Mortalität sowie geringeren histopathologischen Veränderungen und entzündlicher Infiltration des Lungengewebes der Mäuse unter LPS-Stimulation. Zudem war die Expression entzündlicher Zytokine sowie von NF- κ B-Komponenten bei LPS-Stimulation unter einem knockdown signifikant verringert.

Bei humanen dendritischen Zellen konnte gezeigt werden, dass die lncRNA lung cancer associated transcript 1 (LUCAT1) unter LPS-Stimulation in ihrer Expression gesteigert ist.⁵⁸ Des Weiteren konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass LUCAT1 die über Interferon-Typ-I vermittelte Immunantwort in dendritischen Zellen begrenzt (transduziert über den Transkriptionsfaktor signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)) und zudem an der Regulation weiterer Zytokine wie IL-6 beteiligt ist.

Über die beschriebenen lncRNAs hinaus gibt es eine große Menge weiterer lncRNAs, deren Wirkmechanismus teils noch nicht bekannt ist.⁴⁶ Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass noch weitere Mechanismen existieren.

Die ursprüngliche Definition von lncRNA stieß im Laufe der weiteren Erforschung aus mehreren Gründen auf Kritik:⁴⁰ Zum einen ist die Grenze von 200 Nukleotiden willkürlich und Folge der Technik, mit der die RNA aufbereitet wurde.⁵⁹ Zum anderen werden protein-codierende Transkripte meist über einen offenen Leserahmen, also eine Sequenz zwischen einem Start- und Stopcodon, von mehr als 100 Triplets definiert.⁶⁰ Bei diversen lncRNAs wurden jedoch kurze offene Leserahmen mit weniger als 100 Triplets gefunden, welche kleine Proteine von essentieller Bedeutung codieren.⁶¹ Zudem kann eine RNA codierende und nicht-codierende Funktionen gleichzeitig beinhalten.⁶² Mercer et al. haben daher eine alternative Definition vorgeschlagen, nach der lncRNA RNA-Moleküle sind, die primäre oder gespleißte Transkripte sein können, die nicht anderen Klassen kurzer RNA wie mikro-RNA oder struktureller RNA wie transfer-RNA zugeordnet werden können.⁶³

1.4 Mesenchymale Stamm-/Stromazellen

Mesenchymale Stamm-/Stromazellen (MSC) zeichnen sich durch ihr multipotentes Differenzierungspotential aus,⁶⁴ sind in situ undifferenziert und können sich durch Zellteilung selbst erneuern.⁶⁵ Sie konnten in verschiedensten Geweben und Organen in ihrer perivaskulären Nische nachgewiesen werden.⁶⁶ Isolationen von MSC können sehr heterogen sein und bisher konnte kein einzigartiger Marker für diese Zellen gefunden werden.⁶⁷ Daher wurden von der internationalen Gesellschaft für zelluläre Therapie mehrere Kriterien für MSC definiert: Plastikadhärenz, Expression von CD73, CD90 und CD105, fehlende Expression von CD11b oder CD14, CD19 oder CD79 α , CD45 und HLA-DR sowie das Potential zur trilinearen Differenzierung zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten.⁶⁸

MSC lassen sich aus Knochenmark sowie fast jedem anderen Gewebe isolieren.⁶⁶ Durch minimal-invasive Methoden, etwa Liposuktion, kann aus Fettgewebe besonders gut Material zur Gewinnung größerer Mengen von MSC gewonnen werden. Nach dem Konsens der International Fat Applied Technology Society werden diese Zellen adipose-derived stem/stromal cells (ASC) genannt.⁶⁹ Sie können sich zu Zellen des Meso-, Ekto- und Endoderms differenzieren.^{70,71} Die Bezeichnung als pluripotente Zellen wurde bisher aber nicht allgemein akzeptiert.⁶⁷ Zudem wurde gezeigt, dass ASC pro- und anti-inflammatorische Zytokine sezernieren können.⁷²

Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie von großem Interesse für Anwendungen in der regenerativen Medizin. Bisher konnte zum Beispiel in Metaanalysen von Tierversuchen gezeigt werden, dass die Regeneration von Neuronen, Herzgewebe, Haut, bestimmten Schleimhäuten und ischämischem Muskelgewebe durch ASC unterstützt werden kann.^{73,74} Auch randomisierte, kontrollierte klinische Studien wurden bereits durchgeführt, die etwa einen therapeutischen Nutzen bei Arthrose zeigen konnten.⁷⁵

1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit

ASC sind durch die Sezernierung von Zytokinen an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt. LncRNAs wurden bereits im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen beschrieben. In dieser Arbeit sollen die Veränderungen von lncRNA im Rahmen einer akuten, bakteriellen Entzündungsreaktion bei ASC untersucht werden, welche möglicherweise an der Regulation und Vermittlung der Entzündungsprozesse beteiligt sein könnten.

Dazu wurde zunächst ein *in vitro* Entzündungsmodell mit ASC etabliert. Die Stimulation erfolgte mit gereinigten Bakterientoxinen, die Quantifizierung der Entzündungsreaktion erfolgte durch Messung der Expressionsänderung von Zytokinen mittels qPCR. Eine Bestätigung der Messungen der qPCR erfolgte mittels ELISA. Zudem wurden ASC hinsichtlich der Eignung als Entzündungsmodell verglichen mit im nephrologischen Labor etablierten Kulturen von konditionell immortalisierten proximalen Tubuluszellen (ciPTC).

Im nächsten Schritt erfolgte eine Sequenzierung der RNA von stimulierten und nicht-stimulierten Zellen. Die sequenzierte RNA wurde zuvor auf ihre Integrität getestet und von ribosomaler RNA bereinigt. Die Ergebnisse der Sequenzierung dieser beiden Gruppen wurden auf Unterschiede der Expression hin analysiert. Die detektierten codierenden Gene, die unter Stimulation in ihrer Expression verändert waren, wurden einer gene set enrichment analysis (GSEA) unterzogen, um veränderte biologische Prozesse und Mechanismen zu detektieren. Die detektierten lncRNAs, die in ihrer Expression veränderten waren, sollten in weiteren Stimulationen mittels qPCR bestätigt werden.

Zuletzt erfolgte die Transfektion mit siRNA zum knockdown von spezifischen lncRNAs. Transfizierte und nicht-transfizierte und anschließend stimulierte und nicht-stimulierte Zellen wurden mittels qPCR auf die Expression von Zytokinen und lncRNA untersucht und untereinander verglichen.

2 Material

Tab. 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav (CertoClav CV-EL 10l/12l)	CertoClav Sterilizer, Leonding (Österreich)
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Brutschrank (HERAcell 150)	Heraeus Instruments, Hanau
Chip Priming Station (5065-44014)	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Digitalkamera (LG-H815)	LG Electronics, Seoul (Südkorea)
Durchlichtmikroskop (Axiovert 10)	Zeiss, Oberkochen
Elektrophorese-System (Easy-Cast B2)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
ELISA-Photometer (Apollo 1 LB 911)	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Flüssigkeits-Absaugsystem	Vacuubrand, Wertheim
Heizplatte/Magnetrührer (Ikamag RCT)	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Magnetische Halterung für Reaktionsgefäße (DynaMag-2)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
PCR-Geräte: 7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham (USA)
Primus	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter	Metrohm, Filderstadt
Pipetten: Eppendorf research	Eppendorf, Hamburg
Finnpipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Gerät	Hersteller
Pipettierhilfe (Pipetboy acu 2)	Integra Biosciences, Biebertal
Sequenziersystem (NextSeq 550)	Illumina, San Diego (USA)
Spectrophotometer (Nanodrop ND-1000)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Sterilbank (LaminAir HB 2448)	Heraeus Instruments, Hanau
Stromversorgung Elektrophorese (Powerpac 1000)	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
UV-Flächenstrahler	Konrad Benda, Wiesloch
Vortexer: Whirlmixer MS3	Fisons, Ipswich (UK) IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Waage (EMB 200-3)	Kern & Sohn, Balingen-Frommern
Wasserbad (1083)	GFL, Burgwedel
Zentrifugen: Galaxy Mini Biofuge pico Megafuge 1.0 Mikro 22 R	VWR, Radnor (USA) Heraeus Instruments, Hanau Heraeus Instruments, Hanau Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Tab. 2: Software und Datenbanken

Software	Hersteller
ABI 7900HT Sequence Detection Systems Software (Version 2.4.1)	Applied Biosystems, Waltham (USA)
Adobe Illustrator (Version 16.0.0)	Adobe inc., San José (USA)
Agilent 2100 Expert Software (Revision B.02.10)	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Citavi (Version 6.4.0.35)	Swiss Academic Software, Wädenswil

Software	Hersteller
	(Schweiz)
Enrichr	Ma'ayan Laboratory, New York City (USA)
Ensembl (Version 102, Genome Reference Consortium Human Build 38 p12)	European Bioinformatics Institute, Hinxton (UK)
ExpressionSuite (Version 1.1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Gene Ontology	Gene Ontology Consortium
ISCapture (Version 3.6.6)	Tucsen Photonics, Fuzhou (China)
Kallisto (Version 0.45.0)	Pachter Lab, Pasadena (USA)
KEGG (Version 97.0)	Kanehisa Laboratories, Kyoto (Japan)
LibreOffice Calc (Version 7.0.3.1)	The Document Foundation, Berlin
LibreOffice Writer (Version 7.0.3.1)	The Document Foundation, Berlin
Nanodrop 1000 Mess-Software (Version 3.8.1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
NextSeq Control Software (Version 2.2.0)	Illumina, San Diego (USA)
Photoread (Version 1.3)	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Prism (Version 5.01)	GraphPad, San Diego (USA)
Sleuth (Version 0.30.0)	Pachter Lab, Pasadena (USA)

Tab. 3: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
96-well PCR-Platten	GeneOn, Ludwigshaven am Rhein
Filter (Millex-HV)	Merck Millipore, Billerica (USA)
Glaspipetten (Falcon)	Corning, New York (USA)
Latexhandschuhe (Peha-soft nitrile)	Hartmann, Heidenheim an der Brenz

Material	Hersteller
PCR-Gefäße	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (TipOne)	Starlab International, Hamburg
Polypropylen Röhrchen (Cellstar)	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Real-time qPCR Klebefolien	GeneOn, Ludwigshaven am Rhein
RNeasy Mini Spin Säulen	Qiagen, Hilden
Serologische Pipetten (Costar Stripette)	Corning Incorporated, Corning (USA)
Zellkulturflaschen (Cellstar)	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)

Tab. 4: Chemikalien

Material	Hersteller
Agarose (SeaKem LE)	Lonza, Basel (Schweiz)
Biocoll-Lösung	Biochrom, Berlin
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
Destilliertes Wasser, DNase/RNase-frei (Ultrapure)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure, 1 M	Merck, Darmstadt
Ethanol, 100 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ethanol, 70 %, vergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, 80 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Magnesiumchlorid, 50 mM	VWR, Radnor (USA)
NaCl-Lösung, 0,9 %	Fresenius Kabi, Bad Homburg
PBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham

Material	Hersteller
	(USA)
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween20)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Puffer RLT (ID 79216)	Qiagen, Hilden
Puffer RPE (ID 1018013)	Qiagen, Hilden
Puffer RW1 (ID 1053394)	Qiagen, Hilden
Salzsäure	AppliChem, Darmstadt
Schwefelsäure, 2 M	AppliChem, Darmstadt
TMB	AppliChem, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
β -Mercaptoethanol, 14.3 M	Carl Roth, Karlsruhe

Tab. 5: *Konditionell immortalisierte Zellen, Zellkulturmedien und Mediensupplemente*

Material	Hersteller
ciPTC (Lizenz 2018/2019)	Cell4Pharma, Oss (Niederlande)
DMEM (Kat.-Nr. 11039021)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
EGF	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Human-Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Penicillin/Streptomycin, 10000 U/ml (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Selen	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Material	Hersteller
Transferrin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trijodthyronin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Tab. 6: Proteine, Enzyme und bakterielle Toxine

Material	Hersteller
IL-6-ELISA (Kat.-Nr. 31670069)	Immuno Tools, Friesoythe
Interferon γ	Strathmann, Hamburg
Interleukin-1 β	Strathmann, Hamburg
Kollagenase Typ 1	CellSystems, Troisdorf
LPS-EB Ultrapure (E. Coli O111:B4)	Invivogen, San Diego (USA)
LTA-SA (S. Areus)	Invivogen, San Diego (USA)
Reverse Transkriptase, 200 U/ μ l	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
RNase-Inhibitor, 40 U/ μ l	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Streptavidin Poly-HRP-HS	Immuno Tools, Friesoythe
Tumornekrosefaktor α	Strathmann, Hamburg

Tab. 7: Material für molekularbiologische Analysen

Material	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
DNA Gel Loading dye (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM)	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesbach
Generuler (50 bp)	Thermo Fisher Scientific, Waltham

Material	Hersteller
	(USA)
NextSeq 500/550 High Output Kit v2 75 Zyklen (Kat.-Nr. FC-404-2005)	Illumina, San Diego (USA)
Nukleinsäure-Färbungsmittel (Gel-Red)	Biotium, Fremont (USA)
PCR-Puffer (10x)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
qPCR Mix (5x HOT Firepol EvaGreen)	Solis Biodyne, Tartu (Estland)
Random Primer	Steinbrenner Laborsysteme, Wies- bach
rRNA Depletions-Kit (NEBNext E6310)	New England BioLabs, Ipswich (USA)
Vorbereitungs-Kit für RNA-Bibliothe- ken (NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit E7420)	New England BioLabs, Ipswich (USA)

Tab. 8: Primer für codierende Transkripte

Name (Transkriptlänge)	Basensequenz
NCBI Referenzsequenz	
Aktin (169 bp) NM_001101.5	Forward: ACT GGA ACG GTG AAG GGT GAC Reverse: AGA GAA GTG GGG TGG CTT TT
ICAM1 (500 bp) NM_000201.3	Forward: CAG TGA CTG TCA CTC GAG ATC T Reverse: CCT CTT GGC TTA GTC ATG TGA C
IL-6 (150 bp) NM_000600.4	Forward: AAA GAT GGC TGA AAA AGA TGG ATG C Reverse: ACA GCT CTG GCT TGT TCC TCA CTA C
TNF α (354 bp) NM_000594.4	Forward: CGG GAC GTG GAG CTG GCC GAG GAG Reverse: CAC CAG CTG GTT ATC TCT CAG CTC
NGAL (197 bp)	Forward: GAC CCG CAA AAG ATG TAT GCC

Name (Transkriptlänge)	Basensequenz
NCBI Referenzsequenz	
NM_005564.4	Reverse: CTC ACC ACT CGG ACG AGG TA
FZD2 (86 bp)	Forward: TTT CTG GGC GAG CGT GAT
NM_001466.4	Reverse: AAA CGC GTC TCC TCC TGT GA
FZD7 (121 bp)	Forward: CAA CGG CCT GAT GTA CTT TAA GG
NM_003507.2	Reverse: CAT GTC CAC CAG GTA GGT GAG A
ROR2 (89 bp)	Forward: GTG CGG TGG CTA AAG AAT GAT
NM_004560.4	Reverse: ATT CGC AGT CGT GAA CCA TAT T
WNT5A (78 bp)	Forward: TCT CCT TCG CCC AGG TTG TA
NM_003392.7	Reverse: CTT CTG ACA TCT GAA CAG GGT TATTC
WNT2 (80 bp)	Forward: GGA TGA CCA AGT GTG GGT GTA AG
NM_003391.3	Reverse: GTG CAC ATC CAG AGC TTC CA

Tab. 9: Primer für nicht-codierende Transkripte

Ensembl Transkript Name und ID (Transkriptlänge)	Basensequenz
AC037198.1-201	Forward: TGG AGC CAG AAC CAA CAA CA
ENST00000478845.2 (76 bp)	Reverse: CTG TCA GGG GAG CCA TAC AC
H19-202	Forward: TCT CAG GAG GGA GGA TGG TG
ENST00000412788.5 (266 bp)	Reverse: CAC CCC AGC TGG AGA CCT
H19-203	Forward: ATC GGT GCC TCA GCG TTC
ENST00000414790.6 (212 bp)	Reverse: ATG TCC TGC TTG TCA CGT CC
LINC00607-205	Forward: ATG GGA CAT TTC AGC TTG CC
ENST00000445174.5 (133 bp)	Reverse: CAG GAC TGG CAG TAA TCG GG
NEAT1-202	Forward: GCC ATG TAG GAG AGC ATG GTA
ENST00000501122.2 (155 bp)	Reverse: ACA CCC ACC TTC ATT GGC TT
TGFB2-OT1-201	Forward: AGG TAT CCT CAT GCT GGG GT

Ensembl Transkript Name und ID (Transkriptlänge)	Basensequenz
ENST00000625474.1 (143 bp)	Reverse: CTT TGG ATT CCC GCC TCC TT

Die Primer wurden von Thermo Fisher Scientific (Darmstadt) hergestellt.

Tab. 10: siRNA

Gen bzw. Produktbezeichnung	Gen-ID	Hersteller
Negativ-Kontrolle No. 1 (Silencer select)	-	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
H19 (Silencer select)	283120	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zellisolation

Die Isolation der ASC erfolgte nach der im nephrologischen Labor etablierten und beschriebenen Methode.⁷⁶ Die ciPTC wurden von Cell4Pharma bezogen.⁷⁷

Alle genutzten Materialien, die mit Zellen in Kontakt kamen, waren steril oder wurden vorher autoklaviert. Die Arbeiten erfolgten an einer sterilen Werkbank, die vorher mit Ethanol 70 % gereinigt wurde sowie mit Handschuhen, die ebenfalls vorher mit Ethanol 70 % gereinigt wurden. Die Nährmedien wurden wie in Tabelle 11 und 12 beschrieben angesetzt. Die Enzymlösung wurde aus 100 mg Kollagenase Typ 1 und 20 ml PBS angesetzt und vor Nutzung durch einen 45 µm Filter gegeben.

Das genutzte Fettgewebe stammte aus Liposuktionen gesunder SpenderInnen. Eine konkrete Zuordnung einer Zellisolation zur Spenderin oder zum Spender war nicht möglich. Zu jeder Isolation waren nur anonymisierte Eckdaten der SpenderInnen wie Alter und Geschlecht bekannt.

30-35 g Fettgewebe wurden in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Dazu wurden 2,5 ml Enzymlösung und 12,5 ml PBS gegeben. Es folgte 1 h Inkubation im Wasserbad bei 37°C mit gelegentlichem Schütteln des Röhrchens. Nach der Inkubation wurde der Ansatz bei 300 g für 5 min zentrifugiert, das entstandene Pellet abpipettiert und in ein neues Röhrchen übertragen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Das neue Röhrchen wurde erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Danach wurden 10 ml NaCl-Lösung dazugegeben, geschüttelt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 20 ml NaCl-Lösung gelöst. Die Lösung wurde durch ein 125 µm Sieb gegeben. In ein neues 50 ml Röhrchen wurden 14 ml Biocoll-Lösung gegeben. Darauf wurden 20 ml filtrierte Zelllösung pipettiert, ohne dass es zu einer Vermischung kam. Danach

wurde bei 400 g für 20 min zentrifugiert. Die milchige Phase, die sich in der Mitte gebildet hatte, wurde abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt. Es wurde NaCl-Lösung dazugegeben und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in Nährmedium gelöst. Die isolierten Zellen wurden in eine Zellkulturflasche überführt.

Tab. 11: Nährmedium für ASC

Material	Anteil
DMEM	-
FCS	10 %
Penicillin/Streptomycin	1 %

Tab. 12: Nährmedium für ciPTC

Material	Konzentration (Arbeitslösung)
DMEM	-
Insulin	5 µg/ml
Transferrin	5 µg/ml
Selen	5 ng/ml
Hydrocortison	500 ng/ml
EGF	10 ng/ml
Trijodthyronin	6,5 ng/ml
FCS	10 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml

3.1.2 Kultivierung der Zellen

Die in der Flasche kultivierten ASC wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und maximaler Wasserdampfsättigung kultiviert. Abweichend davon betrug die Temperatur für ciPTC in der Proliferationsphase für 10 Tage 32°C und anschließend in der Differenzierungsphase 37°C. Das Nährmedium wurde alle drei Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt.

Sobald die Zellen in der Flasche mikroskopisch dicht genug gewachsen waren, erfolgte eine Aufteilung auf mehrere neue Flaschen. Dazu wurde das alte Medium entfernt und die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurde Trypsin/EDTA-Lösung dazugegeben und für 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde Nährmedium dazugegeben und die gesamte Lösung in ein Röhrchen übertragen. Es folgte eine Zentrifugation bei 300 g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in Nährmedium gelöst. Die Zell-Lösung konnte nun auf zwei bis drei neue Flaschen verteilt werden, je nach mikroskopischer Dichte der Besiedlung der Ausgangsflasche.

3.2 Zellstimulation

3.2.1 Stimulation mit bakteriellen Toxinen

Die Stimulation und das Ansetzen der Lösungen erfolgte unter den bei der Zellisolation beschriebenen, sterilen Bedingungen. Das Nährmedium wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Toxine LTA und LPS wurden mit Nährmedium auf die jeweiligen Zielkonzentrationen verdünnt. Cytomix wurde aus Nährmedium, Interferon γ (200 U/ml), Interleukin-1 β (25 U/ml) und Tumornekrosefaktor α (10 ng/ml) angesetzt. Das alte Nährmedium wurde aus den Kulturflaschen entfernt und die verdünnten Toxine oder der Cytomix hinzugefügt. Danach wurden die Kulturen bei 37°C, 5 % CO₂ und maximaler Wasserdampfsättigung bebrütet. Nach Ende der Inkubation und vor der RNA-Extraktion wurde ein Teil des Nährmediums der angesetzten Proben in Reaktionsgefäßen asserviert und bei -80°C gelagert. Kontroll-Kulturen wurden in Standard-Zellkulturmedium kultiviert. Zellisolation und Passage waren bei beiden Ansätzen (Kontrolle und Stimulation) identisch.

3.2.2 Transfektion

Die Transfektion erfolgte in Anlehnung an die von Wirth et al. etablierte Methode.⁷⁸ Die beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten an der sterilen Werkbank unter den gleichen sterilen Bedingungen wie die Isolation der Zellkulturen.

PEI wurde in sterilem Wasser gelöst (Stammlösung 1 mg/ml) und der pH-Wert mittels Salzsäure auf 7,4 eingestellt. Diese Lösung wurde durch einen 0.22 µm Filter gefiltert. Die siRNA- und PEI-Stammlösungen wurden mit DMEM auf eine Konzentration von 10 nM bzw. 1 µg/ml verdünnt. Beide Lösungen wurden miteinander vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Nährmedium der Zellkulturen wurde entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit der PEI-siRNA-Lösung über 24 h inkubiert. Auf die restlichen Kulturen wurde serumfreies DMEM gegeben. Im Anschluss wurde zu allen Proben normales, serumhaltiges Nährmedium gegeben. Sofern eine Probe zusätzlich stimuliert werden sollte, war im Medium zudem eine entsprechende Toxin-Konzentration.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion erfolgte bei Raumtemperatur. Für den Lyse-Puffer wurde Puffer RLT mit 1 % β-ME vermischt. Das Medium in den Kulturflaschen wurde entfernt und 600 µl Lyse-Puffer in die Flaschen gegeben. Der Puffer wurde durch schwenken verteilt. Danach wurden 600 µl Ethanol 70 % dazugegeben und erneut geschwenkt. Das Lysat wurde durch auf- und abpipettieren gemischt. 700 µl des Lysats einer Probe wurden je auf eine RNeasy Mini Spin Säule gegeben, die vorher in ein Reaktionsgefäß gesetzt wurde. Die Säulen wurden für 15 sec bei mindestens 8000 g zentrifugiert und der im Reaktionsgefäß aufgefangene Überstand verworfen. Nun wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säulen gegeben

und erneut zentrifugiert sowie der Überstand verworfen. Danach wurde der Vorgang zweimal mit 500 µl RPE-Puffer durchgeführt, wobei die zweite Zentrifugation 2 min dauerte. Vor Benutzung des RPE-Puffers wurde das vom Hersteller gelieferte RPE-Konzentrat mit der vierfachen Menge Ethanol 100 % vermischt. Die Säulen wurden nun auf neue Reaktionsgefäße gesetzt. Auf die Säulen wurden 30 µl RNase-freies Wasser gegeben und für 1 min zentrifugiert. Die im Wasser gelöste, isolierte RNA wurde zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert oder für längere Lagerung bei -80°C eingefroren.

3.3.2 Reverse Transkription

Alle Proben wurden während der Verarbeitung auf Eis gelagert. Mithilfe eines Spektrophotometers wurde die RNA-Konzentration der isolierten RNA-Lösungen bestimmt. Anhand der gemessenen Konzentration wurde das notwendige Volumen der jeweiligen Probe für eine RNA-Menge von 1 µg bestimmt. Dieses Volumen wurde in ein PCR-Gefäß gegeben und auf ein Gesamtvolumen von 11,25 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Dazu wurden je Probe 3,55 µl RT-Reaktionspuffer gegeben. Die Proben wurden durch Schwenken vermischt und dann für 30 min bei 37°C, anschließend für 2 min bei 75°C inkubiert.

Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Proben mit 10 µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Die erzeugte cDNA wurde zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert oder für längere Lagerung bei -80°C eingefroren.

Tab. 13: RT-Reaktionspuffer (passend für eine Probe)

Material	Menge
Random primer	1 µl
Magnesiumchlorid	0,66 µl
PCR-Puffer	0,66 µl
dNTP	0,66 µl
β-ME	0,33 µl
RNase-Inhibitor	0,16 µl
Reverse Transkriptase	0,083 µl

3.3.3 Real-time qPCR

In die Kammer einer 96-well-Platte wurden je 1 µl cDNA und 19 µl qPCR-Reaktionspuffer gegeben. Dabei wurde jede Probe auf der Platte in dreifacher Ausführung angesetzt. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und für 3 min bei 300 g zentrifugiert.

Die Platte wurde gemäß Tabelle 15 im Thermocycler inkubiert. Dabei wurde die Phase 2 insgesamt 40-mal wiederholt. Die Fluoreszenz-Messung erfolgte immer nach dem dritten Abschnitt der Phase 2. Nach Abschluss der Messung und Inkubation wurden die Platten bei -20°C gelagert für eine spätere Analyse der PCR-Produkte.

Tab. 14: Real-time qPCR-Reaktionspuffer (passend für eine Probe)

Material	Menge
SYBRGreen	4 µl
RNase-freies Wasser	14 µl
Primer (forward) 5 µM	0,5 µl
Primer (reverse) 5 µM	0,5 µl

Tab. 15: Inkubationszyklus real-time qPCR

Phase	Dauer	Temperatur
Phase 1	12 min	95°C
Phase 2	15 sec	95°C
	15 sec	63°C
	20 sec	72°C

Neben den Primern der ausgewählten Zielgene erfolgte immer ein Ansatz auf der Platte mit Aktin-Primern, die bei der Berechnung der Expressionsunterschiede mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode⁷⁹ als Referenz dienten. Aus den ermittelten CT-Werte der Triplikate aller Proben wurden Mittelwerte errechnet. Vom mittleren CT-Wert der Ziel-Gene wurde der mittlere CT-Wert des Referenzgens subtrahiert (ΔCT). Dann wurde vom ΔCT -Wert der Stimulationen der ΔCT -Wert der Kontroll-Proben subtrahiert ($\Delta\Delta\text{CT}$). Zur Berechnung der Expressionsänderung wurde 2 mit $-\Delta\Delta\text{CT}$ potenziert. Wenn die Standardabweichung in der Darstellung der Expressionsänderung berücksichtigt wurde, wurde sie anhand der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte berechnet und anschließend zu $-\Delta\Delta\text{CT}$ addiert bzw. davon subtrahiert und erst dann zur Basis 2 potenziert. Bei Stichproben von $n = 1$ wurde die Standardabweichung anhand der technischen Replikate bestimmt. Dazu wurden die ΔCT -Werte von Kontrolle und Stimulation potenziert und addiert. Von dieser Summe wurde die Quadratwurzel bestimmt. Für die Auswertung der CT-Werte (und die davon abgeleiteten Werte) wurde die Software „ExpressionSuite“ genutzt, für die statistischen Analysen und Visualisierungen der Ergebnisse die Software „Graph Pad Prism“, für die Optimierung der Visualisierungen die Software „Adobe Illustrator“. Der statistische Vergleich zwischen Kontrolle und Stimulation erfolgte anhand der ΔCT -Werte, der statistische Vergleich von Stimulationen untereinander anhand der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte. Die Testung

auf Signifikanz erfolgte mittels zweiseitigen, ungepaarten Students t-test. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant, $<0,01$ als sehr signifikant und $<0,001$ als höchst signifikant gewertet. Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich Fehlerbalken auf biologische Replikate. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden Abbildungen mit RQ-Werten auf der Y-Achse zur Basis 2 logarithmisch skaliert. Da jegliche Kontrollen per definitionem einen RQ von 1 haben und damit auf dem Niveau der X-Achse liegen, wurden die Balken der Kontrollen der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. Biologische Replikate wurden erst ab einer Stichprobengröße von 3 in den statistischen Tests berücksichtigt.

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Der Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) wurde aus 40 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 1 mM EDTA zusammengemischt und mit Essigsäure auf einen pH von 8,5 eingestellt. Zum TAE-Puffer wurden 2 % Agarose gegeben. Dies wurde unter Rühren langsam erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Danach wurde zur Mischung GelRed im Verhältnis 1:10000 gegeben. In die Elektrophorese-Kammer wurde ein Platzhalter für die Probetaschen eingesetzt. Das Agarose-Gel wurde in die vorbereitete Kammer gegossen. Die Folie der 96-well-Platten wurde abgelöst und die PCR-Produkte der gewünschten Proben in ein neues PCR-Gefäß übertragen. Dazu wurden 4 μ l Ladungsfarbstoff gegeben und dann für 1 min bei 300 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 75°C inkubiert. Aus dem erstarrten Gel wurde der Platzhalter entfernt und das Gel in eine Wanne gesetzt. Die Wanne wurde mit TAE-Puffer aufgefüllt. In die Probetaschen des Gels wurden je die inkubierten Proben sowie in die erste Tasche ein vordefinierter Standard gefüllt. Auf die Seite der Probetaschen wurde die Anode angeschlossen. Auf der gegenüberliegenden Seite die Kathode. Am Stromaggregat wurden 80 V Gleichstrom einge-

stellt. Nach 2 h wurde der Strom ausgestellt und das Gel auf einen UV-Leuchtschirm gelegt. Der Schirm wurde mit einer Kammer abgedunkelt. Das beleuchtete Gel wurde durch eine entsprechende Öffnung der Kammer fotografiert.

3.3.5 Messung der RNA-Integrität

Die Messung der RNA-Integrität (RIN-Score) erfolgte nach Herstellerangaben (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) auf einem Bioanalyzer 2100 mittels eines Agilent RNA 6000 Nano Kits. Es wurden 550 μ l der Gel-Matrix auf dem im Kit enthaltenen Filter platziert und für 10 min bei 1500 g zentrifugiert. Das Farbstoff-Konzentrat wurde für 10 sec auf dem Vortexer geschüttelt und danach kurz abzentrifugiert. Von dem gefilterten Gel wurden 65 μ l zusammen mit 1 μ l Farbstoff-Konzentrat in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Dies wurde auf dem Vortexer geschüttelt und für 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Der RNA Nano Chip wurde mit Gel-Farbstoff-Mischung gemäß Herstellerangaben beladen. Zu jeder Kammer wurden dann 5 μ l Marker pipettiert. Der Standard und die zu untersuchenden RNA-Proben wurden für 2 min bei 70°C denaturiert. Je 1 μ l des Standards sowie der zu untersuchenden RNA-Proben wurden in die dafür vorgesehenen Kammern pipettiert. Der Chip wurde mit einem entsprechenden Adapter in den Vortexer eingesetzt und für 60 sec bei 2400 RPM geschüttelt. Danach wurde der Chip in den Analyzer eingesetzt und die Messung gestartet. Die Bestimmung des RIN-Score erfolgte nach Abschluss der Messung durch die Software.

3.3.6 Depletion ribosomaler RNA

Zu je 12 μ l RNA-Lösung einer Probe wurden 1 μ l rRNA-Depletionslösung und 2 μ l Hybridisierungspuffer aus dem rRNA-Depletionskit gegeben. Danach wurde die Lösung durch Pipettieren vermischt und kurz abzentrifugiert. Es folgte

eine Inkubation im Thermocycler gemäß den Angaben in Tabelle 16. Danach wurden die Proben erneut kurz abzentrifugiert und für die weitere Verarbeitung auf Eis gelagert.

Tab. 16: Inkubationszyklus Depletion ribosomaler RNA

Phase	Dauer	Temperatur
Phase 1	2 Minuten	95°C
Phase 2	Senkung der Temperatur um 0,1°C/sec bis 22°C erreicht sind	
Phase 3	5 Minuten	22°C

Auf Eis wurde gemäß Tabelle 17 der RNase H Master-Mix angesetzt und durch Pipettieren vermischt. Je 5 µl des RNase H Master-Mix wurden zu einer Probe pipettiert und danach durch Pipettieren vermischt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Darauf wurden die Proben kurz abzentrifugiert und wieder auf Eis gelagert.

Tab. 17: RNase H Master-Mix (passend für eine Probe)

Material	Menge
RNase H	2 µl
RNase H Reaktionspuffer	2 µl
RNase-freies Wasser	1 µl

Auf Eis wurde gemäß Tabelle 18 der DNase I Master-Mix angesetzt und durch Pipettieren vermischt. Je 30 µl des DNase I Master-Mix wurden zu einer Probe pipettiert und danach durch Pipettieren vermischt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Darauf wurden die Proben kurz abzentrifugiert und wieder auf Eis gelagert.

Tab. 18: DNase I Master-Mix (passend für eine Probe)

Material	Menge
DNase I	2,5 µl
DNase I Reaktionspuffer	5 µl
RNase-freies Wasser	22,5 µl

Anschließend wurden 110 µl Agencourt RNA-freie XP-Beads zu jeder Probe hinzugefügt und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße auf eine magnetische Halterung gesetzt und gewartet, bis die Lösung klar wurde. Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Es folgten drei Waschgänge mit 200 µl Ethanol 80 % je Probe. Nach je 30 sec Inkubationszeit wurde der Alkohol abpipettiert. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert, der restliche Alkohol entfernt und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Danach wurden 8 µl RNase-freies Wasser dazugegeben und durch Pipettieren mit den Proben vermischt. Die Proben wurden wieder in die magnetische Halterung eingesetzt bis die Lösungen klar wurden. Dann wurden je 6 µl Überstand in neue Reaktionsgefäße übertragen und auf Eis gelagert.

Die so aufbereitete RNA wurde anschließend direkt genutzt zur Erzeugung der RNA-Bibliotheken für die RNA-Sequenzierung.

3.3.7 Erstellung der Bibliotheken für die RNA-Sequenzierung

Zu je 5 µl der zuvor ribosomal depletierten RNA wurden 1 µl random primer und 4 µl Reaktionspuffer zur Synthese des ersten Strangs gegeben und dann durch Pipettieren vermischt. Es erfolgte eine Inkubation bei 94°C für 15 min. Danach wurden die Proben auf Eis gelagert.

Als nächstes wurde der Master-Mix zur Synthese des ersten Strangs gemäß der Tabelle 19 angesetzt. Dieser wurde zu jeder Probe dazugegeben und durch Pipettieren vermischt. Es erfolgte eine Inkubation gemäß Tabelle 20.

Tab. 19: Master-Mix für die Synthese des ersten Strangs (passend für eine Probe)

Material	Menge
RNase-Inhibitor	0,5 µl
Actinomycin D	5 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
RNase-freies Wasser	3,5 µl

Tab. 20: Inkubationsschema DNA-Synthese

Phase	Dauer	Temperatur
Phase 1	10 min	25°C
Phase 2	50 min	42°C
Phase 3	15 min	70°C

Anschließend wurde der Master-Mix zur Synthese des zweiten Strangs gemäß Tabelle 21 angesetzt, zu den Proben gegeben und durch Pipettieren vermischt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 16°C.

Tab. 21: Master-Mix für die Synthese des zweiten Strangs (passend für eine Probe)

Material	Menge
Reaktionspuffer für die Synthese des zweiten Strangs	8 µl
Enzym-Mix für die Synthese des zweiten Strangs	4 µl
RNase-freies Wasser	48 µl

Die AMP-freien XP Beads wurden kurz im Vortexer wieder in Suspension gebracht und anschließend je 144 μl zu jeder Probe gegeben. Diese wurden dann für 10 min auf dem Vortexer gemischt. Es folgten 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Dann wurden die Proben kurz zentrifugiert und für 5 min auf einer magnetischen Halterung gelagert. Der klare Überstand wurde entfernt. Die Proben wurden dreimal mit je 200 μl Ethanol 80 % gewaschen. Die Proben wurden für 5 min an der Raumluft getrocknet. Dann wurden 60 μl Tris-EDTA-Puffer zu jeder Probe gegeben und 2 min auf einem Vortexer vermischt. Die Proben wurden auf einer magnetischen Halterung gelagert, bis der Überstand klar war. Vom Überstand wurden 55,5 μl in neue Reaktionsgefäße übertragen. Zu den Proben wurden nun 6,5 μl Reaktionspuffer und 3 μl Enzym-Mix zur End-Reparatur dazugegeben und für 30 min bei 20°C sowie anschließend 30 min bei 65°C inkubiert.

Die Adapter-Lösung wurde um den Faktor 10 in 10 mM Tris-HCl verdünnt. Nun wurden 15 μl Ligase Master-Mix, 1 μl verdünnte Adapter-Lösung und 2,5 μl RNase-freies Wasser dazugegeben, durch Pipettieren vermischt und kurz abzentrifugiert. Es folgten 15 min Inkubation bei 20°C. Die Volumina der Proben wurden mit RNase-freiem Wasser auf 100 μl aufgefüllt. Danach wurden die Proben mit je 100 μl AMP-freien XP Beads wie bereits beschrieben bereinigt. Abweichend davon wurden aber 52 μl Tris-EDTA-Puffer genutzt. Vom entstandenen Überstand wurden 50 μl in neue Reaktionsgefäße übertragen. Der Vorgang wurde nochmals wiederholt, diesmal jedoch mit 50 μl AMP-freien XP Beads und 19 μl Tris-EDTA-Puffer. Vom entstandenen Überstand wurden je 17 μl in neue Reaktionsgefäße übertragen.

Der PCR-Mix zur Amplifikation der Bibliotheken wurde gemäß Tabelle 22 angesetzt, zu den Proben gegeben und durch Pipettieren vermischt. Es erfolgte

eine Inkubation im Thermocycler gemäß Tabelle 23. Phase 2 wurde dabei insgesamt 15-mal wiederholt.

Tab. 22: PCR-Mix zur Amplifikation der Bibliotheken

Material	Menge
User Enzym	3 µl
PCR-Master-Mix	25 µl
Primer	2,5 µl
Universal-PCR-Primer	2,5 µl

Tab. 23: Inkubationszyklus Amplifikation der Bibliotheken

Phase	Dauer	Temperatur
Phase 1	15 min	37°C
	30 sec	98°C
Phase 2	10 sec	98°C
	75 sec	65°C
Phase 3	5 min	65°C

Die Proben wurden erneut mit AMP-freien XP Beads gereinigt. Dafür wurden 45 µl Bead-Suspension und 23 µl Tris-EDTA-Puffer genutzt. Insgesamt wurden 20 µl des entstandenen Überstands in neue Reaktionsgefäße übertragen.

3.3.8 RNA-Sequenzierung

Die erstellten Sequenzierungs-Bibliotheken wurden im Bioanalyzer wie bereits beschrieben qualitätskontrolliert. Anschließend erfolgte die Sequenzierung unter Verwendung des NextSeq-Kits. Die Kartuschen wurden gemäß Herstellerangaben mit den vorbereiteten Bibliotheken beladen.

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mithilfe der Software „kallisto“⁸⁰ in der Standardkonfiguration basierend auf der Ensembl-Annotation⁸¹ analysiert.

Die Differentialanalyse der Genexpression von Kontrolle und Stimulation erfolgte durch die Software „sleuth“⁸² unter Verwendung des Wald-Tests⁸³. Die GSEA der detektierten codierenden Gene sowie grafische Darstellung dieser Ergebnisse erfolgte mittels „Enrichr“.^{84,85} Bei der grafischen Darstellung mittels Volcano Plot bedeutet eine tiefere Farbe eine höhere Signifikanz, grau bedeutet nicht signifikant ($p \geq 0,05$). Als Datenbanken für die GSEA wurden KEGG^{86,87,88} und GO^{89,90} genutzt. Die Auswahl der langen nicht-codierenden Transkripte erfolgte entsprechend der Richtlinien von Ensembl.⁹¹

3.4 Immunologische Analysemethoden

3.4.1 IL-6-ELISA

Der Assay wurde nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Zuerst wurde ein Wasch-Puffer, der aus PBS mit 0,05 % Tween20 besteht, und ein Block-Puffer, der aus PBS, 2 % BSA und 0,05 % Tween20 besteht, angesetzt. Der Capture-Antikörper wurde in 500 μ l PBS in Lösung gebracht und dann 1:100 mit PBS verdünnt. In die Kammern einer 96-well-Platte wurden je 100 μ l der gelösten Antikörper gegeben. Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Platte mit je 300 μ l Block-Puffer pro Loch gewaschen. Es folgte eine Inkubation über 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde der Puffer abgesaugt. Der IL-6-Standard wurde in einer Verdünnungsreihe mit Block-Puffer zu folgenden Konzentrationen verdünnt: 1 ng/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 10 pg/ml. Die untersuchten Proben wurden 1:10 und 1:100 mit Block-Puffer verdünnt. Jeder Ansatz wurde als Duplikat angesetzt. Zwei Kammern wurden nicht befüllt und dienten als Leer-Probe. Die Platte wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte fünfmal mit Wasch-Puffer gewaschen. Streptavidin wurde 1:1000 mit PBS ver-

dünnt und je 100 μl dieser Lösung in jede Kammer gegeben. Es folgten 30 min Inkubation bei Raumtemperatur und anschließend fünfmaliges Waschen mit Wasch-Puffer. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 μl TMB je Kammer gestartet. Es folgte eine Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur. Danach wurden 50 μl Schwefelsäure in jede Kammer gegeben. Die Platte wurde im Photometer bei 450 nm und 620 nm gemessen.

Von der bei 450 nm gemessenen optischen Dichte wurde jeweils die bei 620 nm gemessene optische Dichte sowie der Mittelwert der in den Leer-Proben gemessenen optischen Dichte subtrahiert. Aus den Messwerten mit bekannter Konzentration wurde eine logistische Regression mit 4 Parametern mittels der Software „Graph Pad Prism“ berechnet. Anhand dessen wurde die Konzentration der weiteren Proben ermittelt. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls mittels der Software „Graph Pad Prism“.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Zellstimulation

4.1.1 Vergleich verschiedener Toxine und Zelltypen

ASC und ciPTC wurden mit LTA oder LPS (je 1000 ng/ml) sowie mit Cytomix stimuliert. In der qPCR wurden bei ASC die Marker TNF α und IL-6 untersucht, bei ciPTC die Marker ICAM1, IL-6 und NGAL. Die Stimulation erfolgte über 4 h mit Ausnahme der Stimulation von ciPTC mit LTA und Cytomix, welche über 24 h erfolgte.

Bei ASC kam es bei allen untersuchten Proben zu einer Steigerung der Expression von IL-6 und TNF α . LPS und Cytomix führten zu einer etwa gleich starken Expressionssteigerung von IL-6. Bei TNF α führte LPS zu einer stärkeren Expressionssteigerung als Cytomix. LTA führte bei beiden Markern zu einer deutlich geringeren Expressionssteigerung als LPS und Cytomix (Abb. 1).

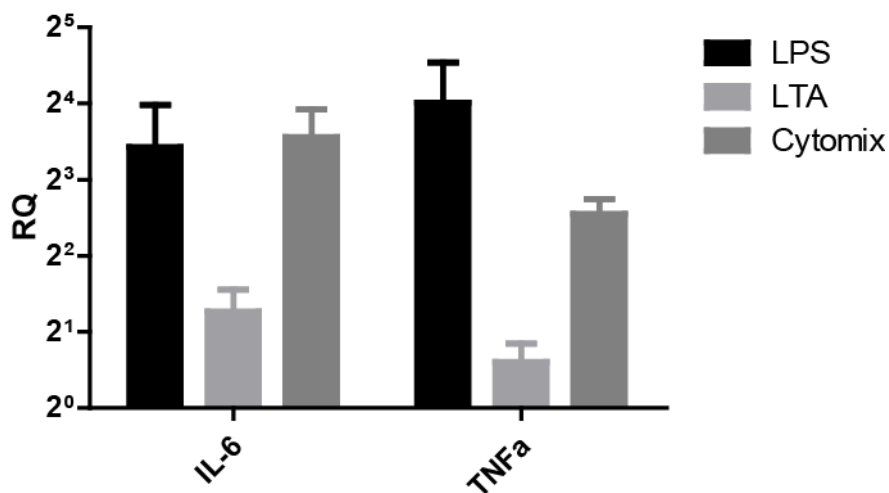


Abb. 1: Ergebnisse der qPCR nach Inkubation von ASC mit unterschiedlichen Toxinen. 4 h Inkubation mit 1000 ng/ml LTA, 1000 ng/ml LPS oder Cytomix. Untersucht wurden die Marker IL-6 und TNF α ($n=1$). Die Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate. RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Bei ciPTC führte eine Stimulation mit LPS zu einer verminderten Expression der Marker ICAM1 und NGAL. LTA führte zu einer geringen Verminderung der Expression von IL-6 und zu einer geringen Expressionssteigerung von NGAL. Cytomix führte zur stärksten Expressionssteigerung von NGAL (Abb. 2).

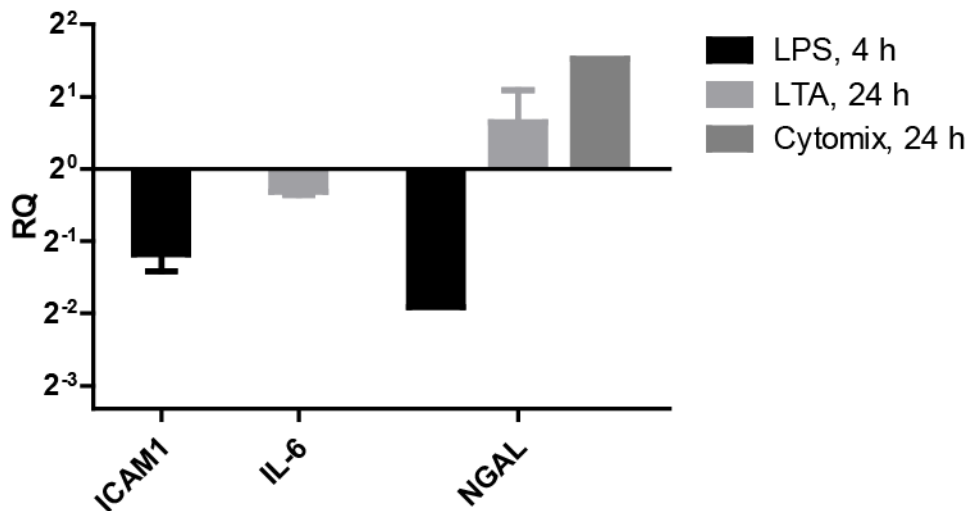


Abb. 2: Ergebnisse der qPCR nach Inkubation von ciPTC mit unterschiedlichen Toxinen. 4 h Inkubation mit 1000 ng/ml LPS (bei Marker ICAM1 $n=2$, bei Marker NGAL $n=1$) sowie Cytomix ($n=1$), 24 h Inkubation mit 1000 ng/ml LTA (bei Marker IL-6 $n=2$, bei Marker NGAL $n=5$). RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

4.1.2 Vergleich verschiedener Stimulationszeiten

ASC wurden mit LPS bei einer Konzentration von 10 ng/ml für jeweils 4 h, 11 h und 24 h stimuliert. Als Marker wurde IL-6 mittels qPCR untersucht. Aus dem Überstand der Zellkultur mit einer Stimulationsdauer von 4 h und 24 h wurde zudem ein IL-6-ELISA durchgeführt.

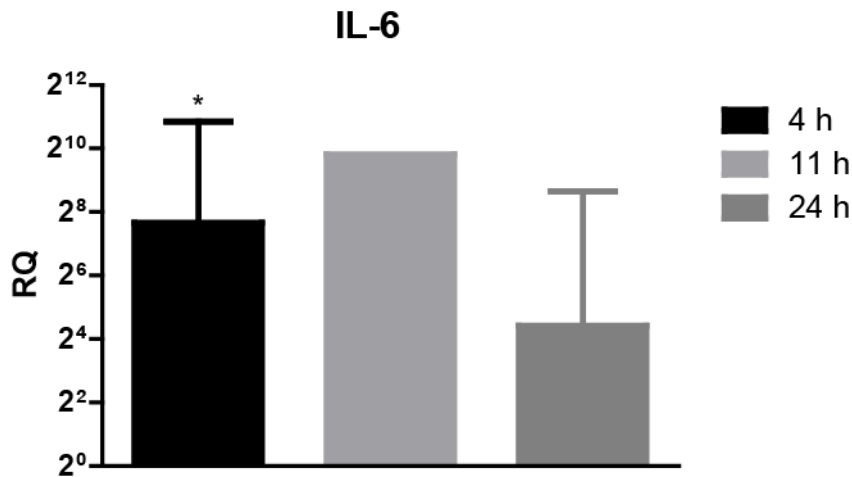


Abb. 3: Ergebnisse der qPCR bei unterschiedlicher Inkubationsdauer. Inkubation von ASC mit 10 ng/ml LPS für je 4 h (n=3), 11 h (n=1) und 24 h (n=2). Untersucht wurde der Marker IL-6. ($p < 0,05 = *$). RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Zu allen Zeitpunkten war die IL-6-Expression gesteigert, jedoch nur bei 4 h Inkubationsdauer signifikant (Abb. 3). Im ELISA zeigten alle stimulierten Proben eine deutliche Steigerung der IL-6-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Diese stieg im Rahmen der beobachteten Zeitspanne mit der Stimulationsdauer an (Abb. 4).

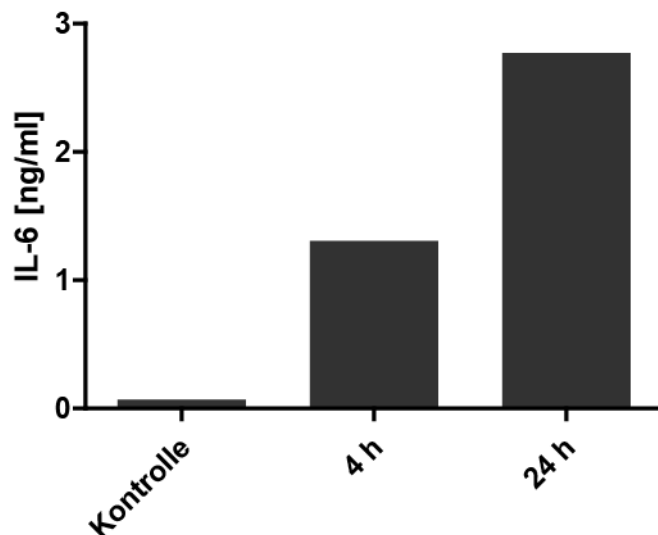


Abb. 4: Ergebnisse des IL-6-ELISA bei unterschiedlicher Inkubationsdauer. Inkubation von ASC mit 10 ng/ml LPS für je 4 h und 24 h sowie Inkubation ohne LPS als Kontrolle (je n=1).

4.1.3 Vergleich verschiedener Toxin-Konzentrationen

ASC wurden für 4 h mit LPS bei einer Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml stimuliert. In der qPCR wurde der Marker IL-6 untersucht. Aus dem Überstand der Zellkulturen wurde zudem ein IL-6-ELISA durchgeführt.

Die Expressionssteigerung bei 1 ng/ml war signifikant, bei 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml sogar höchst signifikant. Für 500 ng/ml konnte mangels Stichproben keine Signifikanztestung erfolgen. Die Expressionssteigerung nahm mit der Konzentration von LPS zu, aber erreichte im Rahmen der hier untersuchten Konzentrationen bei 500 ng/ml ein Maximum und nahm bei noch höherer Konzentration wieder ab (Abb. 5).

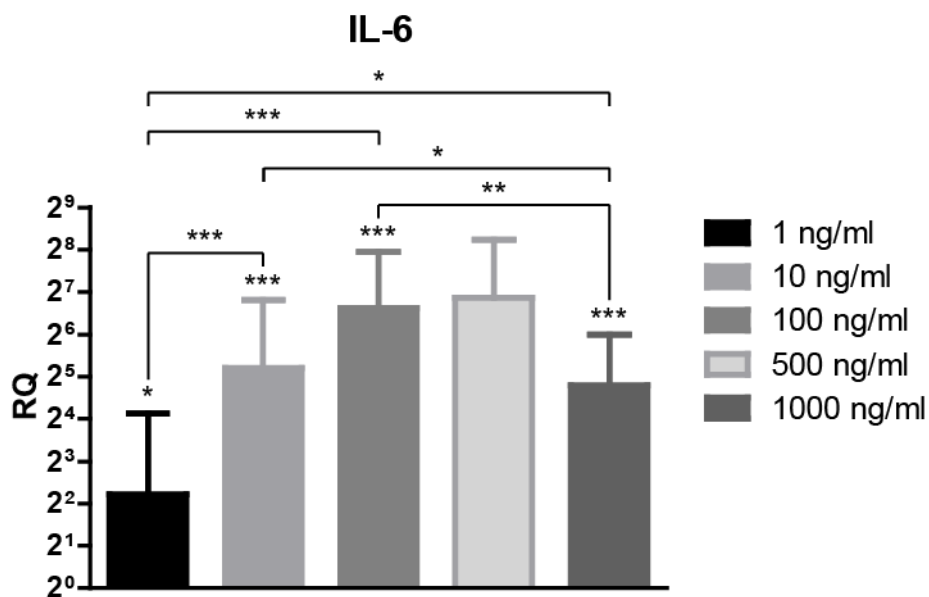


Abb. 5: Ergebnisse der qPCR mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen. 4 h Inkubation von ASC mit LPS bei einer Konzentration von 1 ng/ml (n=5), 10 ng/ml (n=6), 100 ng/ml (n=3), 500 ng/ml (n=2) und 1000 ng/ml (n=3). Untersucht wurde der Marker IL-6. ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$). RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Der Unterschied der Expressionssteigerung zwischen 1 ng/ml und höheren Konzentrationen war stets signifikant oder sogar höchst signifikant. Zwischen 10 ng/ml und 1000 ng/ml bestand ein signifikanter Unterschied, zwischen 100 ng/ml und 1000 ng/ml ein hoch signifikanter Unterschied. Die Konzentration 500 ng/ml konnte aufgrund der mangelnden Stichproben nicht mit den anderen in Signifikanztests verglichen werden.

Im IL-6-ELISA zeigte sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bei allen untersuchten LPS-Konzentrationen eine Steigerung der IL-6-Konzentration. Am geringsten war diese mit 0,231 ng/ml IL-6 bei der kleinsten untersuchten LPS-Konzentration von 1 ng/ml. Mit zunehmender LPS-Konzentration stieg die gemessene IL-6-Konzentration, wobei sich die maximale IL-6-Konzentration von 6,244 ng/ml bei einer Stimulation mit einer LPS-Konzentration von 100 ng/ml zeigte (Abb. 6).

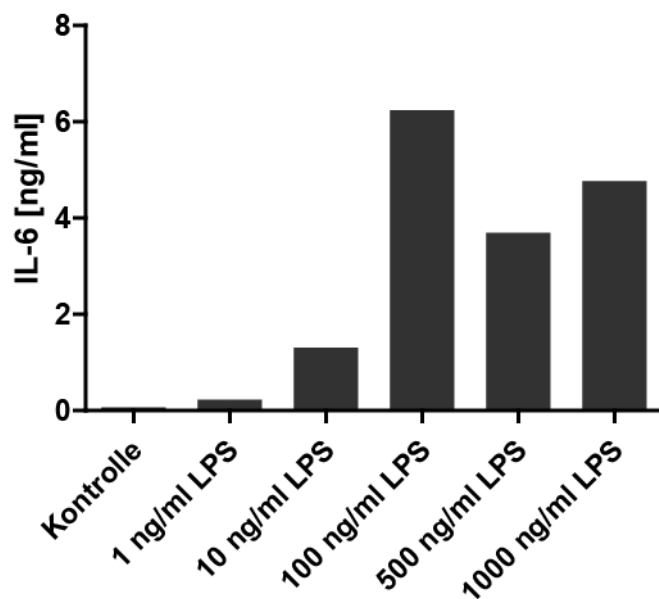


Abb. 6: Ergebnisse des IL-6-ELISA mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen. 4 h Inkubation von ASC mit LPS bei einer von Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml (je n=1).

4.1.4 Vergleich verschiedener Marker mittels qPCR

ASC wurden mit LPS bei einer Konzentration von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 1000 ng/ml stimuliert. In der qPCR wurden die Marker IL-6, TNF α und ICAM1 untersucht. Bei der Konzentration von 1000 ng/ml wurden lediglich die Marker IL-6 und TNF α untersucht.

Bei allen untersuchten Markern kam es bei allen Konzentrationen zu einer Steigerung der Expression. IL-6 zeigte dabei über alle Konzentrationen hinweg deutliche Expressionssteigerungen bei geringerer Standardabweichung als ICAM1 und TNF α (Abb. 7).

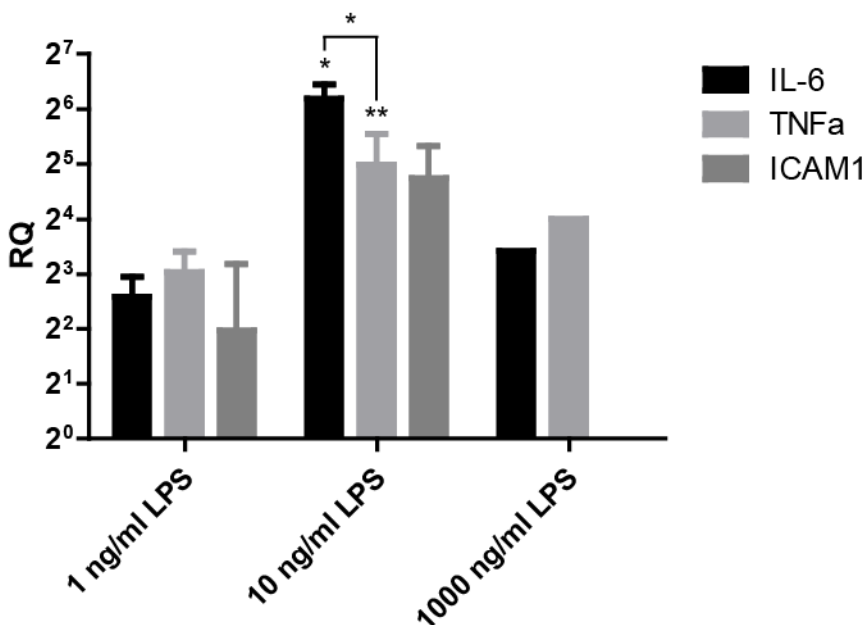


Abb. 7: Ergebnisse der qPCR mit unterschiedlichen Markern. 4 h Inkubation von ASC mit LPS bei einer Konzentration von 1 ng/ml (n=2), 10 ng/ml (n=3) und 1000 ng/ml (n=1). ($p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$). RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Die Expressionssteigerung von IL-6 bei 10 ng/ml LPS war signifikant, die Steigerung von TNF α bei 10 ng/ml LPS sogar sehr signifikant. Bei einer Konzentration von 10 ng/ml zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Ex-

pressionsänderung der Marker IL-6 und TNF α . Aufgrund einer zu kleinen Stichprobengröße der Kontrollen konnte die Signifikanz für die Expressionssteigerung von ICAM1 nicht beurteilt werden.

4.1.5 Vergleich verschiedener Zellisolationen

Zellen aus drei verschiedenen ASC-Isolationen wurden für 4 h mit LPS bei einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert. In der qPCR wurde der Marker IL-6 untersucht.

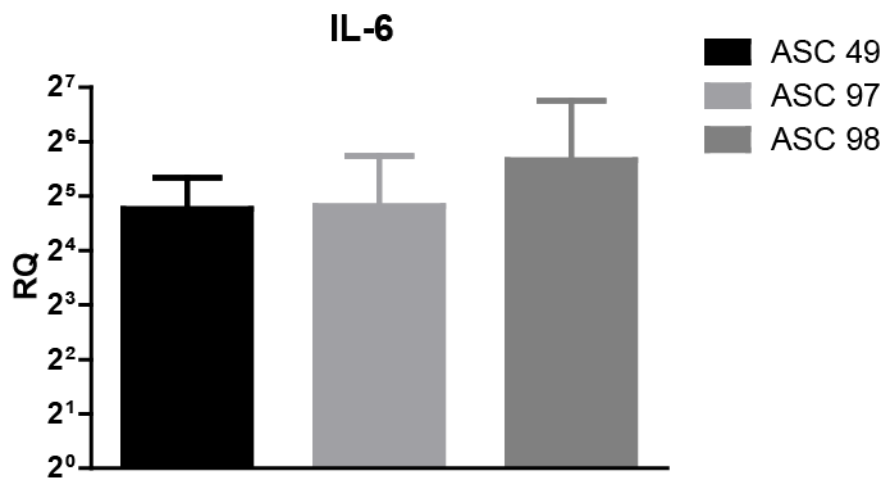


Abb. 8: Ergebnisse der qPCR mit unterschiedlichen Zellisolationen. 4 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS der ASC-Isolation 49 (n=4), 97 (n=9) und 98 (n=4). Untersucht wurde der Marker IL-6. RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Alle Isolationen zeigten eine Steigerung der IL-6-Expression. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Expressionssteigerung zwischen einzelnen Isolationen (Abb. 8).

4.2 RNA-Sequenzierung

Als Stimulationsstandard für die folgenden Versuche wurde die Dauer auf 4 h und das Toxin auf LPS bei einer Konzentration von 10 ng/ml festgelegt. Es wurden nur ASC stimuliert. Für die RNA-Sequenzierung wurden 3 separate Kulturen derselben Isolation und Passage stimuliert. Die Messung der RNA-Integrität zeigte einen sehr guten RIN-Score von 9,6 bis 9,9 (Maximal-Wertung 10).

Die Sequenzierung ergab 46,6 Gigabasenpaare mit etwa 66 Millionen Auslesungen pro Probe bei einem Qualitätsscore > 91,5%. Es zeigte sich eine relevante ($\beta > 1$ bzw. $b < -1$) und signifikante ($p < 0,05$ und $q < 0,05$) Steigerung der Expression von 452 codierenden und 16 langen nicht-codierenden Transkripten. Der β -Wert gibt die Expressionsänderung als Logarithmus zur Basis 2 an, q ist der für multiple Testung korrigierte p -Wert. Die expressionsgesteigerten, codierenden Transkripte konnten 357 verschiedenen Genen zugeordnet werden. Eine signifikante Verminderung der Expression zeigte sich bei 498 codierenden und 42 langen nicht-codierenden Transkripten. Die expressionsverminderten, codierenden Transkripte konnten 403 verschiedenen Genen zugeordnet werden.

4.2.1 Codierende Transkripte

In der GSEA wurden die detektierten codierenden Transkripte mittels „Enrichr“ und den Datenbanken „KEGG“ und „GO“ zu Termen zugeordnet. Dabei zeigten sich für die in ihrer Expression gesteigerten Transkripte 74 signifikante ($p < 0,05$ und $q < 0,05$) KEGG-Terme, 189 GO-Terme für biologische Prozesse und 8 GO-Terme für molekulare Funktionen. Für die in ihrer Expression verminderten Transkripte zeigten sich 11 signifikante KEGG-Terme, 61 GO-Terme für biologische Prozesse und 4 GO-Terme für molekulare Funktionen.

Im Anhang finden sich in den Tabellen 1 bis 6 die konkreten Terme. Es wurden je Datenbank maximal 20 Terme für expressionsgesteigerte bzw. -verminderte

Transkripte aufgeführt. Die Abbildungen 9 bis 11 zeigen die Ergebnisse der GSEA in der Übersicht.

Die signifikantesten KEGG-Terme expressionsgesteigerter Transkripte waren Alkoholismus, diverse bakterielle und virale Infektionserkrankungen für Erreger wie Salmonellen, Legionellen, Influenza A oder Epstein-Barr-Virus, Erkrankungen aus dem rheumatologischen Formenkreis wie rheumatoide Arthritis und Lupus erythematodes und zuletzt die Signalwege inflammatorisch-wirksamer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ (siehe auch Tabelle 1, Anhang). Darüber hinaus fanden sich in der GSEA der expressionsgesteigerten Transkripte weitere KEGG-Terme wie Atherosklerose, biologische Pfade bei Malignomen, Diabetes mellitus Typ 1 und 2, Insulinresistenz und Toll-like-Rezeptor-Signalwege. Die Terme expressionsverminderter Transkripte gehörten zu Adhäsionsproteinen, dem Wnt- und PI3K-Akt-Signalweg und Kardiomyopathien.

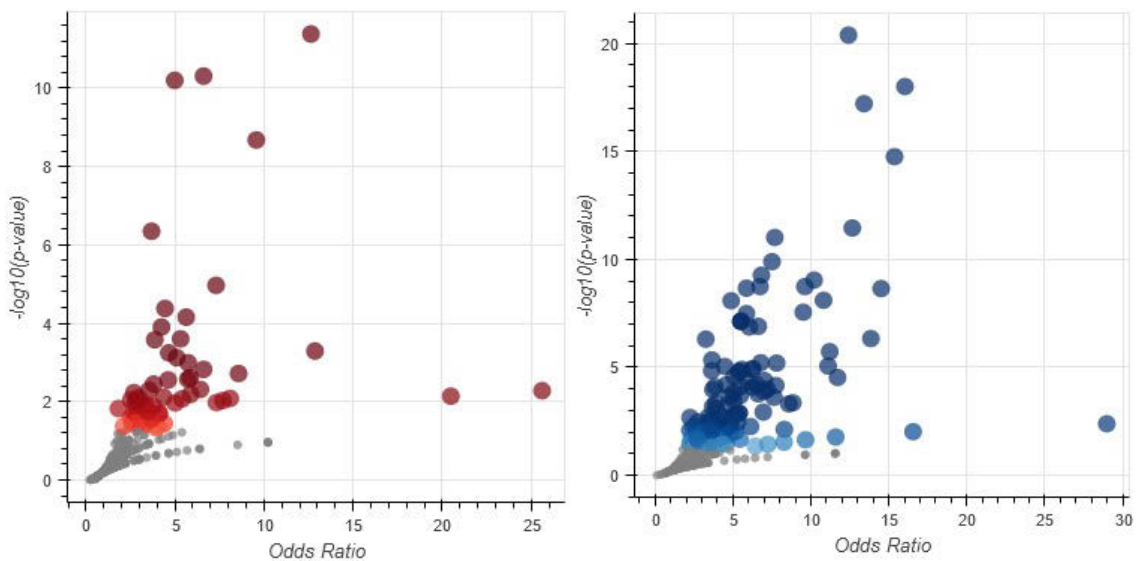


Abb. 9: Volcano plots der KEGG-Terme. Graue Punkte sind nicht-signifikante Terme (nur bezogen auf den p -Wert), rote Punkte signifikante Terme expressionsverminderter Transkripte (links), blaue Punkte signifikante Terme expressionsgesteigerter Transkripte (rechts).

Die GO-Terme biologischer Prozesse, welche den expressionsgesteigerten Transkripten zugehörig sind, konnten überwiegend inflammatorischen Prozessen und Signalwegen zugeordnet werden, vor allem Zytokin-Signalwegen, Reaktion auf LPS und Aktivierung von Leukozyten. Im Gegensatz dazu gehörten die GO-Terme biologischer Prozesse expressionsverminderter Transkripte zu den Bereichen Organisation des Extrazellularraums, Proliferation und Differenzierung.

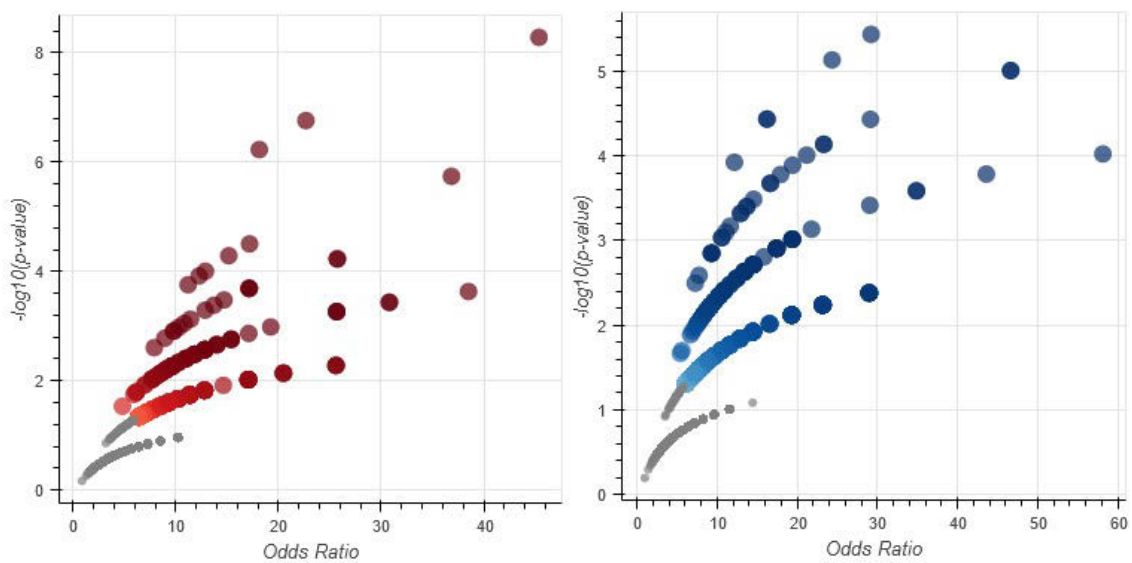


Abb. 10: Volcano plots der GO-Terme biologischer Prozesse. Graue Punkte sind nicht-signifikante Terme (nur bezogen auf den p -Wert), rote Punkte signifikante Terme expressionsverminderter Transkripte (links), blaue Punkte signifikante Terme expressionsgesteigerter Transkripte (rechts).

Die GO-Terme molekularer Funktion der expressionsgesteigerten Transkripte waren aus den Bereichen Zytokin-Aktivität und Zytokin-Rezeptor-Bindung sowie die Bindung an Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Die Bindung von Integrein und Kollagen konnte sowohl transkriptionsgesteigerten als auch -verminderten Transkripten zugeordnet werden.

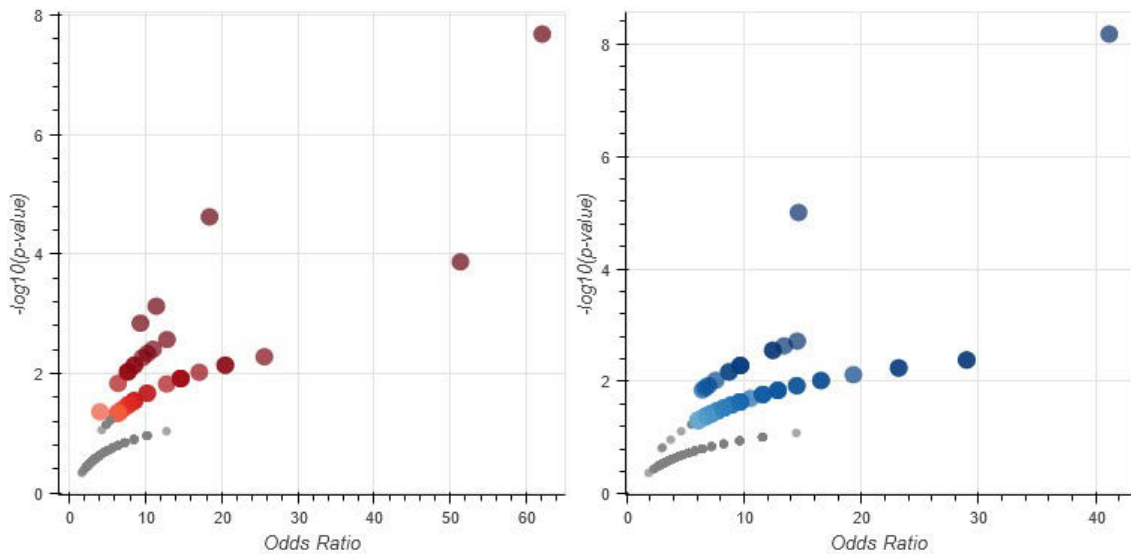


Abb. 11: Volcano plots der GO-Terme molekularer Funktionen. Graue Punkte sind nicht-signifikante Terme (nur bezogen auf den p -Wert), rote Punkte signifikante Terme expressionsverminderter Transkripte (links), blaue Punkte signifikante Terme expressionsgesteigertes Transkripte (rechts).

Folgende detektierte, expressionsverminderte Gene gehören zum Wnt-Signalweg und wurden zur Bestätigung mittels qPCR selektiert: WNT2, WNT5A, ROR2, FZD2, FZD7. Die PCR-Produkte dieser Gene zeigten sich in der Agarose-Gelelektrophorese spezifisch und passend zu ihrer erwarteten Größe.

ASC-Kulturen wurden nach definiertem Standard mit LPS stimuliert. In der qPCR wurden die Gene WNT2, WNT5A, ROR2, FZD2 und FZD7 untersucht.

FZD2 und FZD7 waren passend zu den Sequenzierungsergebnissen expressionsvermindert, jedoch WNT2, WNT5A und ROR2 expressionsgesteigert. Die

hier beobachteten Expressionsänderungen waren jedoch nicht signifikant (Abb. 12).

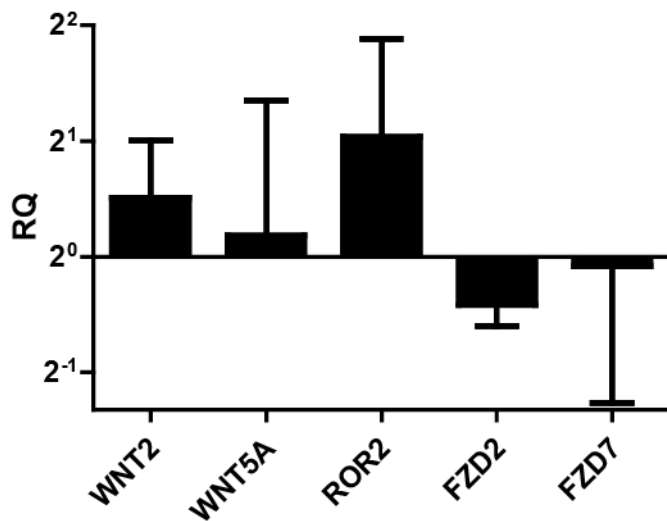


Abb. 12: Ergebnisse der qPCR nach LPS-Stimulation von ASC nach definierten Standard für die Gene WNT2 (n=4), WNT5A (n=4), ROR2 (n=3), FZD2 (n=4) und FZD7 (n=4). RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

4.2.2 Nicht-codierende Transkripte

Unter den langen nicht-codierenden Transkripten waren mehrere neuartige Transkripte, die noch nicht näher beschrieben wurden. Davon waren 11 expressionsgesteigert und 16 -vermindert. Einige bereits näher beschriebene lncRNAs zeigten bei mehreren Transkripten eine Expressionsänderung. Dazu gehörten H19, LINC00632 und AC016831.1.

Folgende lncRNA-Transkripte wurden selektiert, um deren Expressionsänderung in weiteren stimulierten Zellkulturen mittels qPCR zu untersuchen: H19-202, H19-203, NEAT1-202, TGFB2-OT1-201, AC037198.1-201 und LINC00607-205. Für die Transkripte H19-202 und H19-203 zeigten sich in der Gelelektrophorese spezifische PCR-Produkte passend zu ihrer erwarteten Größe.

4.2.2.1 H19-202

Insgesamt erfolgten 12 Versuche mit ASC aus 4 verschiedenen Isolationen nach dem definierten Stimulationsstandard. In der qPCR wurde das Transkript H19-202 untersucht.

Die Gesamtheit der untersuchten Proben zeigte eine im Durchschnitt signifikant verminderte Expression des Transkripts H19-202, passend zum Ergebnis der RNA-Sequenzierung. Das Ausmaß der Expressionsänderung variierte deutlich zwischen den Isolationen. Zwar war H19-202 bei allen untersuchten Isolationen im Schnitt expressionsvermindert, jedoch war das Transkript bei einzelnen Stimulationsversuchen der Isolationen 49 und 97 auch expressionsgesteigert. Daher waren die Standardabweichungen deutlich größer und die Expressionsänderungen für diese Isolationen in den statistischen Tests nicht signifikant (Abb. 13). Die Isolationen 56 und 98 konnten aufgrund mangelnder Stichprobengröße nicht statistisch getestet werden.

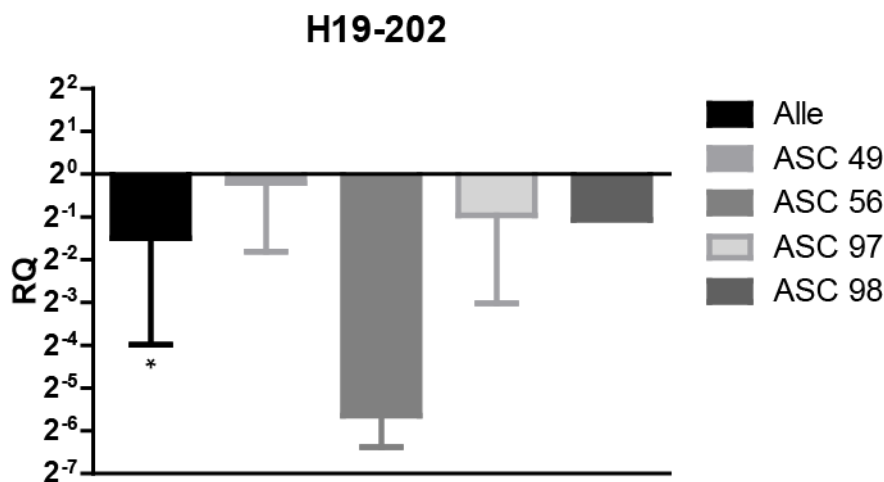


Abb. 13: Ergebnisse der qPCR nach LPS-Stimulation gemäß definiertem Standard der ASC-Isolationen 49 (n=4), 56 (n=2), 97 (n=5) und 98 (n=1) für das Transkript H19-202. Insgesamt sind 12 Stimulationen erfolgt. ($p < 0,05 = *$). RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

4.2.2.2 H19-203

Insgesamt erfolgten 12 Versuche mit ASC aus 4 verschiedenen Isolationen nach dem definierten Stimulationsstandard. In der qPCR wurde das Transkript H19-203 untersucht.

Für das Transkript H19-203 zeigten sich vergleichbare Ergebnisse zu H19-202 (Abb. 13). Die Gesamtheit der untersuchten Proben zeigte ebenfalls eine im Durchschnitt signifikant verminderte Expression, passend zum Ergebnis der RNA-Sequenzierung. Auch H19-203 war bei allen untersuchten Isolationen im Durchschnitt expressionsvermindert und ebenso kam es bei Isolation 49 und 97 bei einzelnen Stimulationen zu einer Expressionssteigerung mit denselben Folgen wie bereits bei H19-202 (Abb. 14). Für die Isolationen 49, 56 und 98 konnte aufgrund mangelnder Stichprobengröße keine statistische Testung erfolgen.

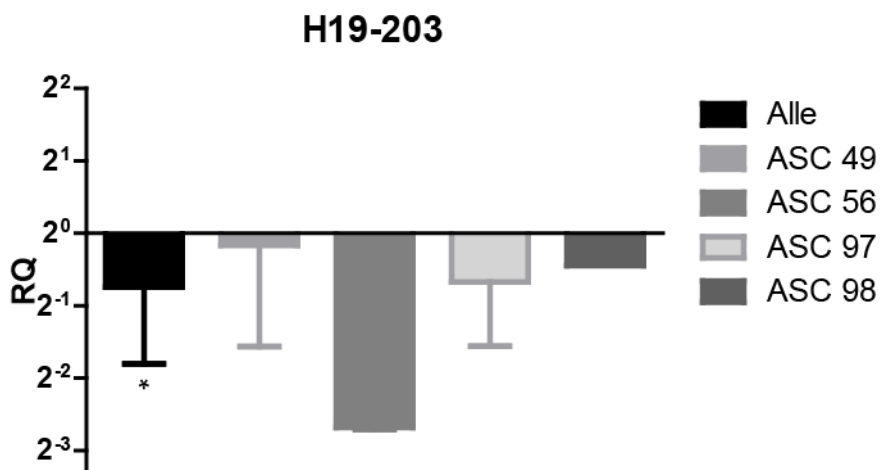


Abb. 14: Ergebnisse der qPCR nach LPS-Stimulation gemäß definiertem Standard der ASC-Isolationen 49 (n=2), 56 (n=2), 97 (n=7) und 98 (n=1) für das Transkript H19-203. Insgesamt sind 12 Stimulationen erfolgt. ($p < 0,05 = *$). RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

4.2.2.3 NEAT1-202

Insgesamt erfolgten 18 Versuche mit ASC aus 5 verschiedenen Isolationen nach dem definierten Stimulationsstandard. In der qPCR wurde das Transkript NEAT1-202 untersucht.

Die Gesamtheit der untersuchten Proben zeigte im Durchschnitt eine geringe Steigerung der Expression, die jedoch nicht signifikant war. Die einzelnen Isolationen zeigten im Schnitt nach Stimulation sowohl eine Expressionssteigerung als auch -verminderung. Jedoch kam es teils auch bei Stimulationen einer Isolation sowohl zu Expressionsminderung als auch -steigerung. Diese Isolationen zeigten eine entsprechend hohe Standardabweichung (Abb. 15). Für die Isolationen 56 und 98 konnte mangels Stichproben keine statistische Testung erfolgen.

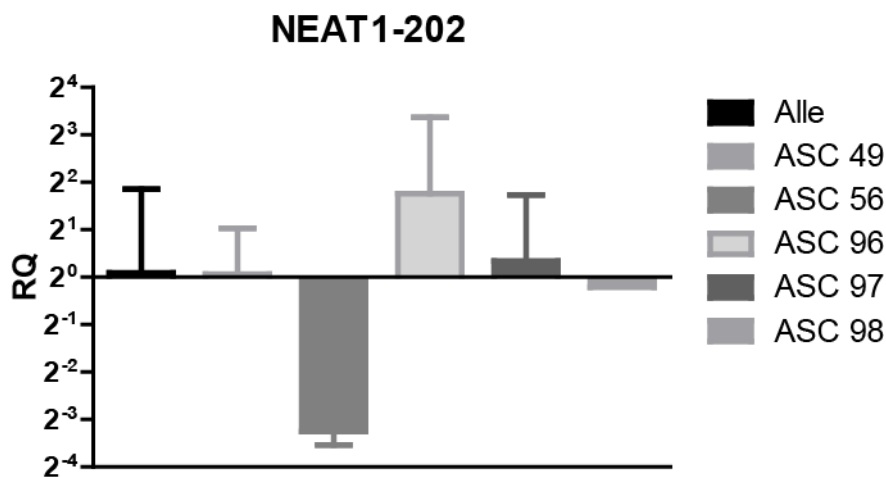


Abb. 15: Ergebnisse der qPCR nach LPS-Stimulation gemäß definiertem Standard der ASC-Isolationen 49 (n=4), 56 (n=2), 96 (n=3), 97 (n=8) und 98 (n=1) für das Transkript NEAT1-202. Insgesamt sind 18 Stimulationen erfolgt. RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

4.2.2.4 TGFB2-OT1-201

Insgesamt erfolgten 10 Versuche mit ASC aus 5 verschiedenen Isolationen nach dem definierten Stimulationsstandard. In der qPCR wurde das Transkript TGFB2-OT1-201 untersucht.

Im Durchschnitt war die Expression des Transkripts TGFB2-OT1-201 nach Stimulation bei den untersuchten Isolationen vermindert, jedoch nicht statistisch signifikant. Es bestand eine deutliche Standardabweichung (Abb. 16). Wie bereits beim Transkript NEAT1-202 variierte die Richtung der Expressionsänderung je nach Isolation, wobei die Richtung der einzelnen Isolationen auch denen beim Transkript NEAT1-202 entsprach (Abb. 15). Bis auf Isolation 96 war bei geringer Stichprobengröße keine statistische Testung möglich.

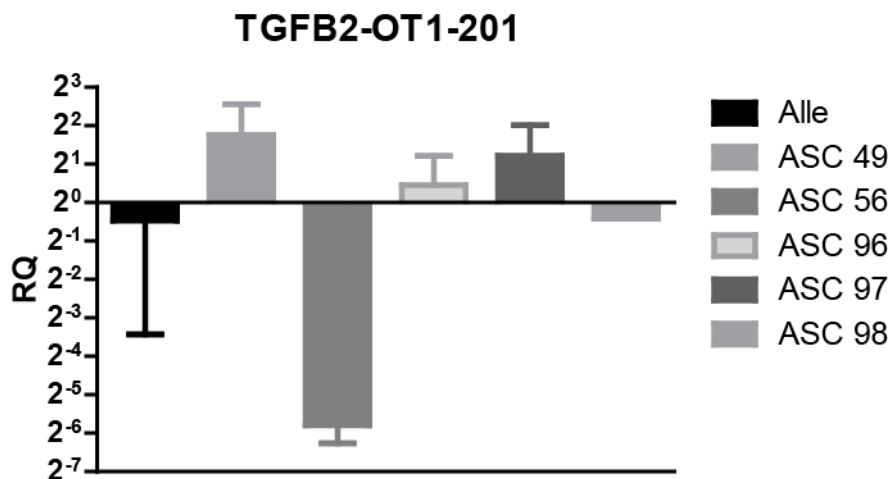


Abb. 16: Ergebnisse der qPCR nach LPS-Stimulation gemäß definiertem Standard der ASC-Isolationen 49 (n=2), 56 (n=2), 96 (n=3), 97 (n=2) und 98 (n=1) für das Transkript TGFB2-OT1-201. Insgesamt sind 10 Stimulationen erfolgt. RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

4.2.2.5 AC037198.1-201

Insgesamt erfolgten 5 Versuche mit ASC aus 2 verschiedenen Isolationen nach dem definierten Stimulationsstandard. In der qPCR wurde das Transkript AC037198.1-201 untersucht.

Für die beiden untersuchten Isolationen 56 und 96 bestanden unterschiedlich gerichtete Expressionsänderungen (Abb. 17) wie auch schon bei NEAT1-202 (Abb. 15) und TGFB2-OT1-201 (Abb. 16). Für die Isolation 96 war die Änderung nicht signifikant, für die Isolation 56 konnte mangels Stichproben kein statistischer Test erfolgen.

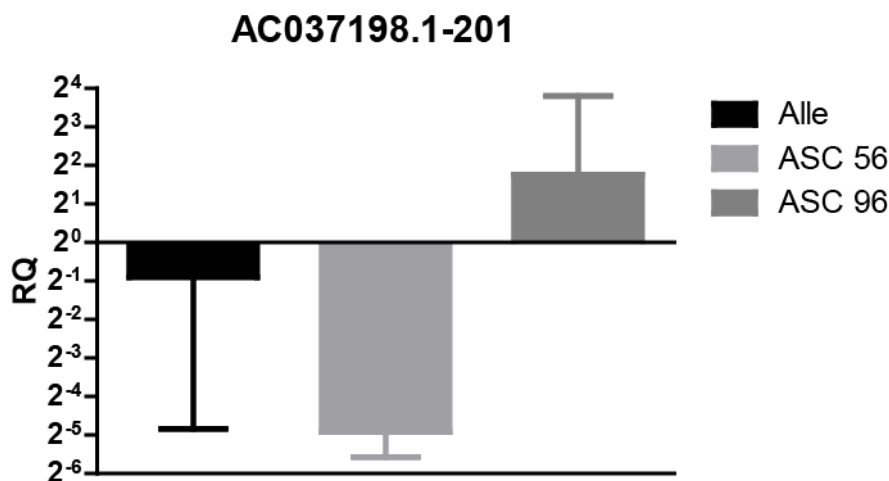


Abb. 17: Ergebnisse der qPCR nach LPS-Stimulation gemäß definiertem Standard der ASC-Isolationen 56 (n=2) und 96 (n=3) für das Transkript AC037198.1-201. Insgesamt sind 5 Stimulationen erfolgt. RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

4.2.2.6 LINC00607-205

Insgesamt erfolgten 5 Versuche mit ASC aus 2 verschiedenen Isolationen nach dem definierten Stimulationsstandard. In der qPCR wurde das Transkript LINC00607-205 untersucht.

Auch hier zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie bei den vorherigen Transkripten (Abb. 15-17): Es bestanden unterschiedlich gerichtete Expressionsänderungen für die beiden untersuchten Isolationen 56 und 96 (Abb. 18). Für die Isolation 96 war die Änderung erneut nicht signifikant, für die Isolation 56 konnte mangels Stichproben kein statistischer Test erfolgen.

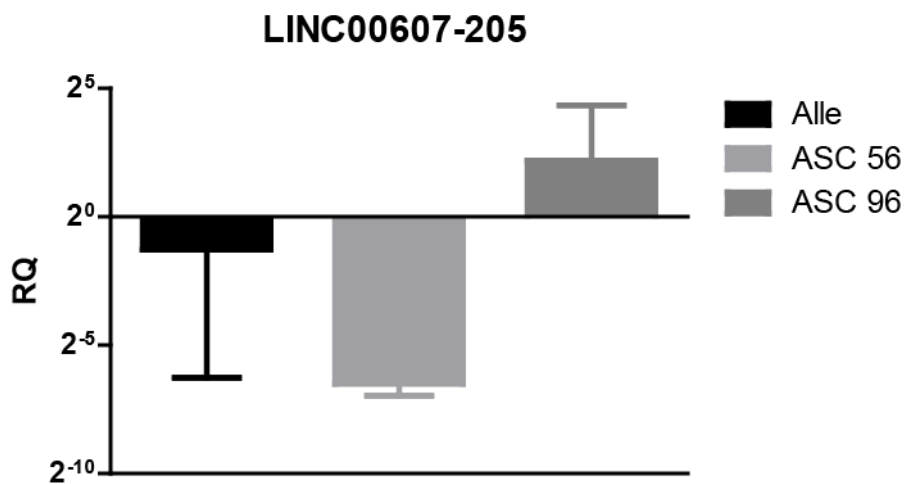


Abb. 18: Ergebnisse der qPCR nach LPS-Stimulation gemäß definiertem Standard der ASC-Isolationen 56 ($n=2$) und 96 ($n=3$) für das Transkript LINC00607-205. Insgesamt sind 5 Stimulationen erfolgt. RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

4.3 Ergebnisse der Transfektion

Im Folgenden wurden ASC-Kulturen mit 10 nM siRNA gegen H19 oder einer Negativ-Kontroll-siRNA über 24 h transfiziert. Als Transfektionsreagenz diente PEI bei einer Konzentration von 1 µg/ml. Einige Kulturen wurden anschließend mit LPS nach definiertem Standard stimuliert. Diese Kulturen wurden untereinander sowie mit den LPS-Stimulationen ohne Transfektion verglichen.

In der qPCR wurden der Marker IL-6 sowie nicht-codierende Transkripte untersucht, die in der RNA-Sequenzierung detektiert und bereits weitergehend mittels qPCR untersucht wurden. Aus dem Überstand der transfizierten Zellkulturen wurde von den Zellen freigesetztes IL-6 Protein durch einen Immunoassay gemessen.

4.3.1 IL-6

Insgesamt erfolgten 11 Versuche mit ASC aus 3 verschiedenen Isolationen nach den beschriebenen Stimulations- und Transfektionsparametern. In der qPCR wurde der Marker IL-6 untersucht. Zudem wurde der Überstand der Kulturen nach Transfektion und Stimulation mittels IL-6-ELISA analysiert.

Bei allen untersuchten Proben war die Expression von IL-6 gesteigert. Bei alleiniger Transfektion war die Expression nur gering und nicht signifikant gesteigert. Eine Stimulation nach vorausgegangener Transfektion zeigte eine stärkere Expressionssteigerung als alleinige Stimulation, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Der Unterschied zwischen alleiniger Transfektion und alleiniger Stimulation oder Transfektion und Stimulation war stets höchst signifikant (19). Einzelne Isolationen und Versuchsbedingungen waren aufgrund der zu geringen Stichprobengröße von der statistischen Testung ausgeschlossen.

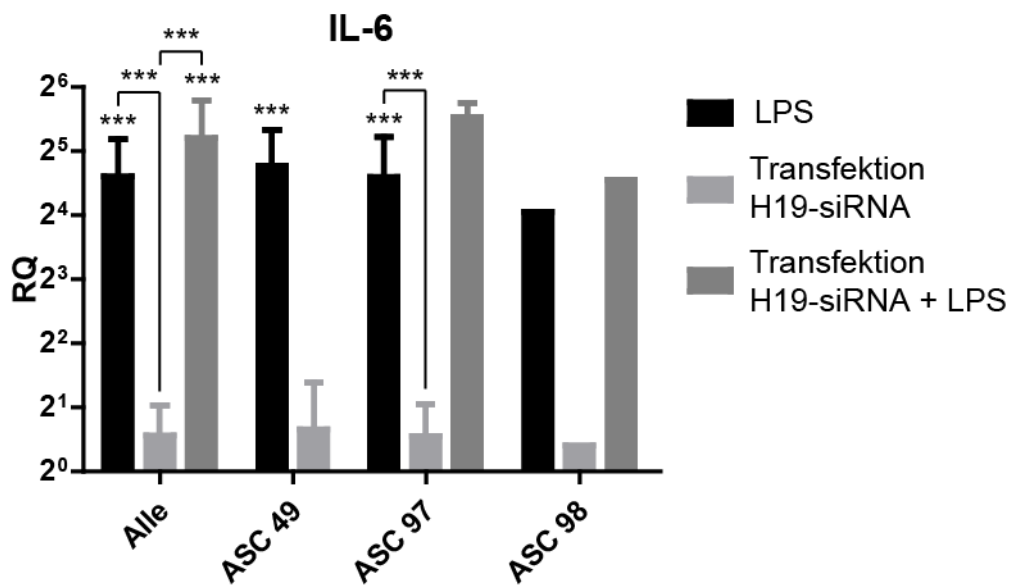


Abb. 19: Ergebnisse der qPCR der Transfektionsversuche für den Marker IL-6. Die ASC-Isolationen 49, 97 und 98 wurden nach definiertem Standard mit LPS stimuliert (insgesamt $n=11$, ASC 49 $n=4$, ASC 97 $n=6$, ASC 98 $n=1$), mit H19-siRNA transfiziert (insgesamt $n=8$, ASC 49 $n=2$, ASC 97 $n=5$, ASC 98 $n=1$) oder transfiziert und anschließend stimuliert (insgesamt $n=3$, ASC 97 $n=2$, ASC 98 $n=1$). ($p < 0,001 = ***$). RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Im IL-6-ELISA zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (0,069 ng/ml) eine leicht erhöhte IL-6-Konzentration (0,289 ng/ml) nach Transfektion (Abb. 20). Die LPS-Stimulation führte zu einer deutlichen Steigerung der IL-6-Konzentration (1,307 ng/ml). Die höchste IL-6-Konzentration wurde bei LPS-Stimulation mit vorausgegangener Transfektion gemessen (1,817 ng/ml).

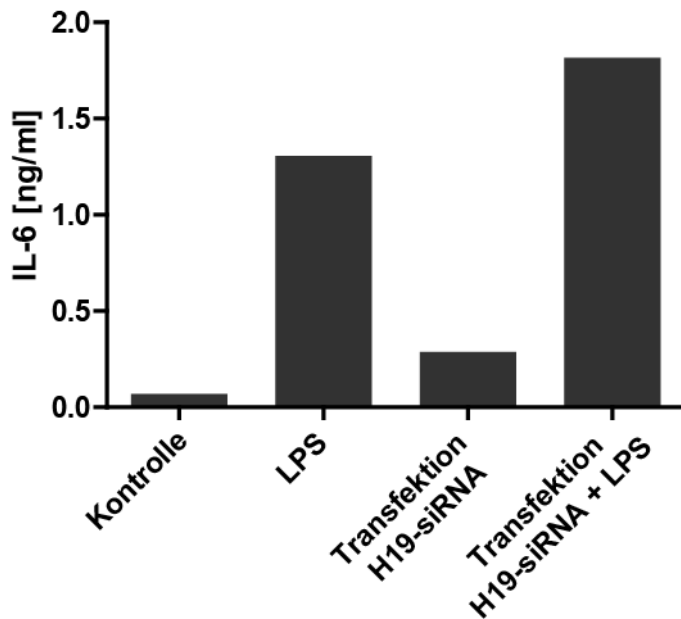


Abb. 20: Ergebnisse des IL-6-ELISA nach LPS-Stimulation, H19-siRNA-Transfektion sowie Transfektion mit anschließender Stimulation von ASC gemäß der definierten Parameter (je n=1). Als Kontrolle dient ASC ohne Stimulation oder Transfektion.

4.3.2 H19-202

Insgesamt erfolgten 10 Versuche mit ASC aus 3 verschiedenen Isolationen nach den beschriebenen Stimulations- und Transfektionsparametern. In der qPCR wurde das Transkript H19-202 untersucht.

Die Gesamtheit der untersuchten Proben zeigte im Durchschnitt unter allen Versuchsbedingungen eine verminderte Expression von H19-202 (Abb. 21). Der stärkste Effekt bestand bei alleiniger Transfektion. Danach folgten die alleinige Stimulation und die kombinierte Transfektion und Stimulation. Den geringsten Effekt hatte die Transfektion mit Kontroll-siRNA. Auch bei den einzelnen Isolationen zeigte die alleinige Transfektion die stärkste Expressionsänderung. Der Effekt der weiteren Versuchsbedingungen variierte je nach Isolation. Bei Isolation 98 war bei Transfektion und nachfolgender Stimulation als einzige Probe die Expression gesteigert, jedoch war die Stichprobengröße hier 1.

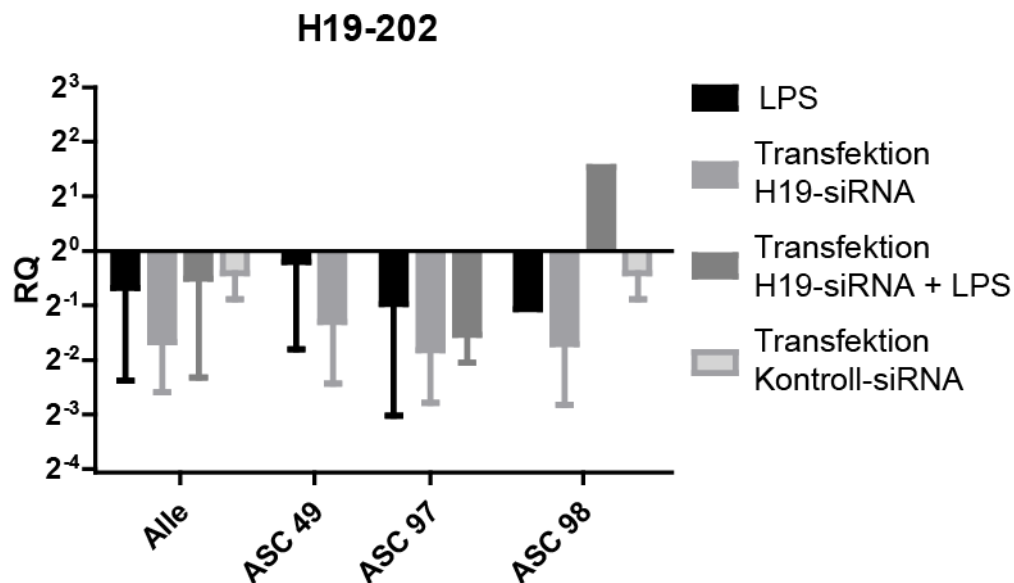


Abb. 21: Ergebnisse der qPCR der Transfektionsversuche für das Transkript H19-202. Die ASC-Isolationen 49, 97 und 98 wurden nach definiertem Standard mit LPS stimuliert (insgesamt $n=10$, ASC 49 $n=4$, ASC 97 $n=5$, ASC 98 $n=1$), mit H19-siRNA transfiziert (insgesamt $n=9$, ASC 49 $n=2$, ASC 97 $n=5$, ASC 98 $n=2$), transfiziert und anschließend stimuliert (insgesamt $n=3$, ASC 97 $n=2$, ASC 98 $n=1$) oder mit Kontroll-siRNA transfiziert (ASC 98 $n=2$). RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Aufgrund der Schwankungen war bei keiner Versuchsbedingung die Expressionsänderung im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Im Vergleich der Versuchsbedingungen und Isolationen untereinander fanden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Einzelne Isolationen und Versuchsbedingungen waren aufgrund der zu geringen Stichprobengröße von der statistischen Testung ausgeschlossen.

4.3.3 H19-203

Insgesamt erfolgten 9 Versuche mit ASC aus 3 verschiedenen Isolationen nach den beschriebenen Stimulations- und Transfektionsparametern. In der qPCR wurde das Transkript H19-203 untersucht.

Die Gesamtheit der untersuchten Proben zeigte im Durchschnitt unter allen Versuchsbedingungen eine Verminderung der Expression (Abb. 22). Am stärk-

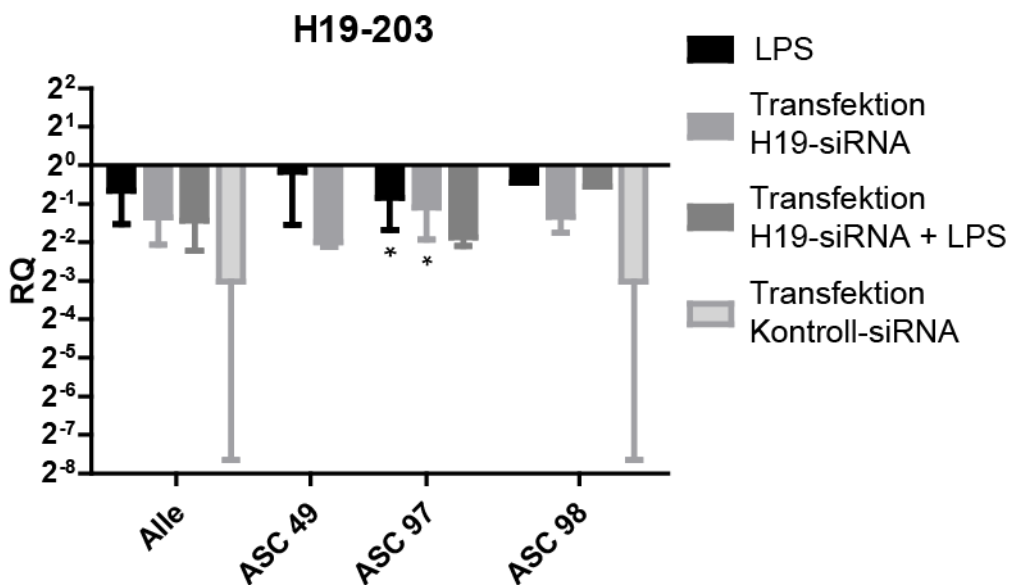


Abb. 22: Ergebnisse der qPCR der Transfektionsversuche für das Transkript H19-203. Die ASC-Isolationen 49, 97 und 98 wurden nach definiertem Standard mit LPS stimuliert (insgesamt n=9, ASC 49 n=2, ASC 97 n=6, ASC 98 n=1), mit H19-siRNA transfiziert (insgesamt n=9, ASC 49 n=2, ASC 97 n=5, ASC 98 n=2), transfiziert und anschließend stimuliert (insgesamt n=3, ASC 97 n=2, ASC 98 n=1) oder mit Kontroll-siRNA transfiziert (ASC 98 n=2). ($p < 0,05 = *$). RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

ten war diese bei Transfektion mit der Kontroll-siRNA, jedoch war die Standardabweichung hier sehr groß und die Stichprobengröße mit 2 gering. Danach folgten mit fast gleich großer Verminderung der Expression die alleinige Transfektion und Transfektion mit anschließender Stimulation. Den geringsten Effekt hatte die alleinige Stimulation. Dies war auch der Fall für die einzelnen Isolationen.

Die Expressionsänderung für die Isolation 97 war unter allen statistisch testbaren Versuchsbedingungen signifikant. Für die Gesamtheit der Proben sowie die übrigen Isolationen waren die Veränderungen nicht signifikant. Zwischen den einzelnen Versuchsbedingungen zeigten sich weder für die Gesamtheit noch für die einzelnen Isolationen signifikante Unterschiede. Auch bei alleiniger Transfektion war zwischen den Isolationen kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Verminderung der Expression. Einzelne Isolationen und Versuchsbedingungen waren aufgrund der zu geringen Stichprobengröße von der statistischen Testung ausgeschlossen.

4.3.4 NEAT1-202

Insgesamt erfolgten 12 Versuche mit ASC aus 3 verschiedenen Isolationen nach den beschriebenen Stimulations- und Transfektionsparametern. In der qPCR wurde das Transkript NEAT1-202 untersucht.

Bei der Gesamtheit der untersuchten Proben war die Expression im Durchschnitt nur gering vermindert bei alleiniger Transfektion und gering gesteigert bei alleiniger Stimulation (Abb. 23). Eine Transfektion und anschließende Stimulation führte zu einer deutlichen Expressionssteigerung. Die Änderung der Expression variierte zwischen den Isolationen. So konnte eine alleinige Transfektion oder Stimulation je nach Isolation die Expression steigern oder vermin-

dem. Nur die Transfektion und anschließende Stimulation zeigte bei den hier untersuchten Proben ausschließlich eine Expressionssteigerung.

Keine der Versuchsbedingungen hatte bei der Gesamtheit der Proben oder den einzelnen Isolationen zu einer signifikanten Änderung der Expression im Vergleich zur Kontrolle geführt. Der Unterschied zwischen alleiniger Stimulation und Transfektion mit anschließender Stimulation war signifikant. Die Unterschiede zwischen den übrigen Versuchsbedingungen sowie der Transfektion der einzelnen Isolationen waren soweit bei ausreichender Stichprobengröße beurteilbar nicht signifikant. Einzelne Isolationen und Versuchsbedingungen waren aufgrund der zu geringen Stichprobengröße von der statistischen Testung ausgeschlossen.

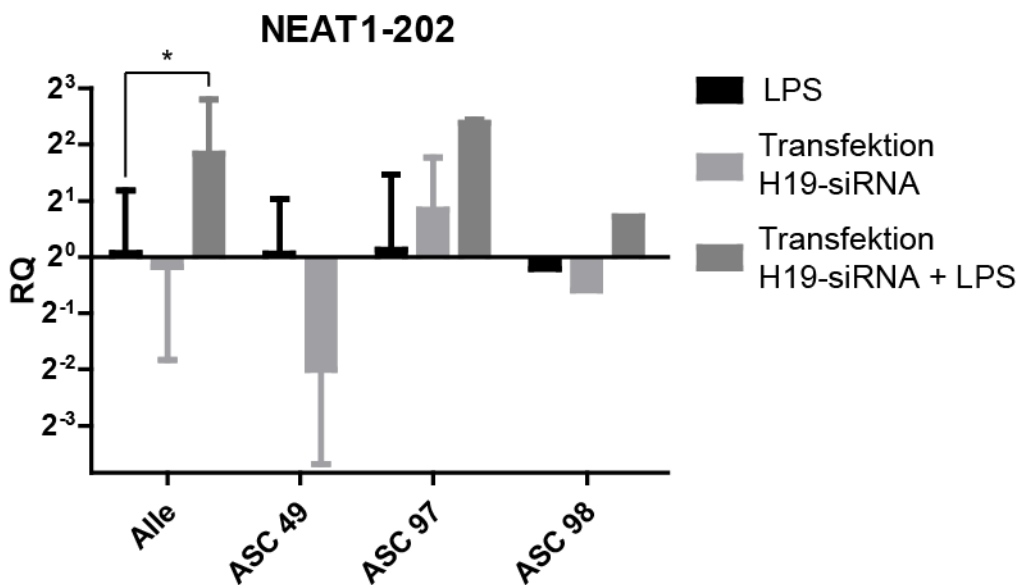


Abb. 23: Ergebnisse der qPCR der Transfektionsversuche für das Transkript NEAT1-202. Die ASC-Isolationen 49, 97 und 98 wurden nach definiertem Standard mit LPS stimuliert (insgesamt $n=12$, ASC 49 $n=4$, ASC 97 $n=7$, ASC 98 $n=1$), mit H19-siRNA transfiziert (insgesamt $n=7$, ASC 49 $n=2$, ASC 97 $n=4$, ASC 98 $n=1$) oder transfiziert und anschließend stimuliert (insgesamt $n=3$, ASC 97 $n=2$, ASC 98 $n=1$). ($p < 0,05 = *$). RQ = Relative Quantifikation. Zur besseren Vergleichbarkeit der RQ wurde die Y-Achse logarithmisch zur Basis 2 skaliert. Da die RQ der Kontrolle per definitionem bei 1 liegt und damit auf dem Niveau der X-Achse, wurde sie der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

5 Diskussion

ASC sind multipotente Zellen⁶⁴, die sich minimal-invasiv gewinnen lassen und großes Potential für Anwendungen in der regenerativen Medizin haben. Darüber hinaus sind sie relevant für Wundheilung⁹² und beteiligt an der Regulation von Entzündungsprozessen⁷². Da ASC im Rahmen von Heilungsprozessen auch mit Bakterien und deren Toxinen konfrontiert werden, ist es wichtig zu verstehen, welche Mechanismen den ausgelösten Reaktionen zugrunde liegen. LncRNAs sind in vielfältiger Weise an der Regulation der Genexpression beteiligt^{45,46} und bieten noch viel Forschungsbedarf für ein ausreichendes Verständnis ihrer exakten Wirkweise und Mechanismen in einzelnen Prozessen.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines bakteriellen Entzündungsmodells mit ASC in vitro als Ausgangspunkt zur Untersuchung der Entzündungsprozesse. Das ASC-Modell wurde verglichen mit im nephrologischen Labor etablierten renalen Epithelzellen zur Eignung als Entzündungsmodell. Durch eine RNA-Sequenzierung wurden veränderte codierende und nicht-codierende Transkripte gefunden und durch anschließende qPCR validiert. Durch gezielten knockdown wurde versucht, die Wirkweise der lncRNA weiter zu untersuchen.

5.1 Zellstimulation

Zunächst wurde ein Entzündungsmodell in Zellkultur mit Bakterientoxinen anhand von ASC und ciPTC evaluiert. Für die untersuchten Toxine LTA und LPS wurden die jeweiligen Rezeptoren TLR2 und TLR4 auf beiden untersuchten Zelltypen beschrieben.^{93,94} Die Entzündungsreaktion wurde anhand der Expression von IL-6, TNF α und ICAM1 untersucht, die allesamt Zielgene von NF- κ B sind.⁹⁵ Die IL-6-Proteinsynthese wurde durch einen Immunoassay bestätigt. Für ciPTC wurde zudem die Expression von NGAL als spezifischen Marker der Schädigung von Nierenzellen bestimmt.⁹⁶ Der Großteil der regulatorischen Ef-

Effekte von lncRNA läuft auf Ebene der RNA-Expression ab. Durch die Quantifizierung der Entzündung auf mRNA-Ebene sollten also die Zeiträume, in denen die Effekte von lncRNA auftreten, am ehesten erfasst werden können. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit einem Mix aus verschiedenen Zytokinen stimuliert, deren Signalwege ebenfalls zur Aktivierung von NF- κ B führen.⁹⁷

Die bei ciPTC beobachteten Expressionsänderungen waren im Vergleich zu ASC nur gering. Bei vergleichbarer Stimulationsdauer und Toxin-Konzentration kam es bei ASC zu einer deutlich stärkeren Expressionssteigerung. Zudem kam es bei ciPTC teils zu einer Verminderung der Expression, was bei ASC nicht beobachtet wurde. Daher wurde das ciPTC-Modell nur zur ersten Einschätzung der Stärke der inflammatorischen Antwort genutzt und danach nicht weiter verwendet. Der Grund für die unterschiedliche Antwort könnte in der Lokalisation der einzelnen Zellen *in vivo* bedingt sein. Tubuluszellen haben durch direkten Kontakt mit dem Urin eine höhere Wahrscheinlichkeit mit Toxinen in Kontakt zu kommen und weisen möglicherweise deshalb eine höhere Toleranz gegenüber diesen auf als ASC, die in der perivaskulären Nische erst bei invasiveren Infektionen mit Toxinen in Kontakt kommen. Die Aussagekraft der hier gezeigten Daten zu ciPTC-Stimulationen ist aufgrund der geringen Stichprobengröße und nur zwei untersuchten Zeitpunkten jedoch nur als Anhaltspunkt zu sehen.

Einen ähnlichen Ansatz für ein Entzündungsmodell mit proximalen Tubuluszellen haben Li et al. verfolgt.⁹⁸ Ihr Modell nutzte primäre proximale Tubuluszellen, LPS in Konzentrationen von 10 bis 100 μ g/ml und NGAL als Marker. Sie konnten eine signifikante Expressionssteigerung von NGAL mit einem Optimum nach 8 Stunden Stimulation mit 20 μ g/ml LPS zeigen. Die Expressionssteigerung überschritt dabei nicht den Faktor 3. Zudem gab es eine, wenn auch nicht signifikante, Verminderung der Expression bei einer Stimulationsdauer

von 2 und 24 Stunden. Angesichts der Daten von Li et al. scheinen die in dieser Arbeit gezeigten Daten sehr plausibel. Zwar hätte die Toxin-Konzentration noch deutlich weiter gesteigert werden können, jedoch ist fraglich, ob solche Konzentrationen in vivo realistisch sind. So ist beispielsweise die LPS-Konzentration im Serum von Sepsis-Patienten in einem Bereich von weniger als 1 ng/ml beschrieben worden.⁹⁹ Andererseits sind bei einer akuten bakteriellen Infektion lokal im Gewebe höhere LPS-Konzentrationen denkbar.

Bei der Stimulation von ASC führte LPS zu einer Expressionsänderung, die im Bereich der Positivkontrolle mit Cytomix und darüber hinaus lag. LTA hingegen zeigte nur geringe Expressionssteigerungen. Kimbrell et al. konnten bei einer Stimulation von Vollblut ex vivo mit LPS und LTA ebenfalls zeigen, dass LPS eine stärkere Produktion von TNF α und IL-6 induziert als LTA.¹⁰⁰ Die Daten von Baer et al. konnten sogar zeigen, dass LTA im Gegensatz zu LPS bei ASC keine signifikante Zytokinproduktion induzieren konnte.¹⁰¹

In den hier vorliegenden Daten führte LPS zu einer deutlichen IL-6-Expressionssteigerung nach 4 h und 11 h, die höchste IL-6-Konzentration fand sich jedoch nach 24 h Stimulation. Aufgrund der geringen Stichprobengröße und großen Standardabweichung ist jedoch fraglich, ob tatsächlich ein signifikanter Unterschied in der IL-6-Expression zwischen den verschiedenen untersuchten Zeitpunkten vorliegt. Dass die IL-6-Konzentration mit der Zeit steigt, kann dadurch erklärt werden, dass IL-6 im beobachteten Zeitraum im Nährmedium stabil¹⁰² ist und extrazellulär akkumulieren kann.

Eine Steigerung der LPS-Konzentration führte bei Konzentrationen jenseits von 10 ng/ml zu keinen signifikanten Unterschieden der Expression. Bei einer Konzentration von 1000 ng/ml sank die Expressionssteigerung im Vergleich sogar wieder. Hypothetisch könnten hohe LPS-Konzentrationen aufgrund von Zelltod zu einer verminderten IL-6-Expression führen, zumal LPS etwa bei Endo-

thelzellen Apoptose induzieren kann.¹⁰³ In zwei Arbeiten, in denen ASC mit vergleichbaren oder höheren LPS-Konzentrationen stimuliert wurde, zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Vitalität.^{101,104} Nichtsdestotrotz hätte auch in dieser Arbeit die Vitalität für die verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht werden sollen, um den etwaigen Zelltod berücksichtigen zu können.

Für die verschiedenen untersuchten Isolationen konnte kein Einfluss auf die IL-6-Expression gezeigt werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass TLR4 und die dazugehörigen Signalkaskaden gut konserviert sind.^{14,105}

Für einzelne Stimulationsbedingungen war die Stichprobengröße teils nur gering, weshalb sich der Effekt dieser Parameter nicht sicher beurteilen lässt. Dies gilt vor allem für die Stimulationsdauer und die qPCR-Marker.

Wu et al. sowie Baer et al. haben ebenfalls Entzündungsmodelle für ASC untersucht.^{101,104} Die LPS-Konzentrationen bei den Untersuchungen von Wu et al. betragen 1 bis 100 µg/ml, die Stimulationsdauer 2 h bis 12 h. Hingegen bei Baer et al. lag die LPS-Konzentrationen bei 10 bis 1000 ng/ml und die Stimulationsdauer bei 4 h. Die Daten von Wu et al. zeigten 6 h Stimulationsdauer und eine Konzentration von 1 µg/ml LPS als optimale Stimulationsbedingungen. Dies liegt nahe an den Stimulationsbedingungen, bei denen die hier vorliegenden Daten die stärkste Expressionssteigerung zeigen konnten (Stimulationsdauer 4 h, LPS-Konzentration 500 ng/ml). Baer et al. fanden – im Gegensatz zu den hier vorliegenden Daten - keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Konzentrationen. Die IL-6-Expression stieg bei Wu et al. mit zunehmender Toxin-Konzentration und Stimulationsdauer, wobei der Unterschied zwischen 6 h und 12 h gering war. Letzteres deckt sich mit den hier vorliegenden Daten. Das Spektrum der beobachteten IL-6-Expressionsänderungen und IL-6-Konzentrationen sind bei Wu et al. und den hier vorliegenden Daten vergleichbar, obwohl

die genutzten LPS-Konzentrationen sich um den Faktor 1000 unterscheiden. Im Vergleich zu den Daten von Baer et al. wurden in den hier vorliegenden Daten höhere Expressionssteigerungen, aber geringe IL-6-Konzentrationen beobachtet. Bei den Daten von Baer et al. ist zu beachten, dass die ASC aus perirenalem Fettgewebe von Tumornephrektomien gewonnen wurden. Im Gegensatz dazu stammten die in dieser Arbeit genutzten Zellen aus Liposuktionen gesunder Menschen. Das Fettgewebe unterschiedlicher anatomischer Lokalisationen sowie die daraus isolierten ASC unterscheiden sich funktionell.¹⁰⁶ Dies und der unterschiedliche Gesundheitszustand der DonorInnen könnte die unterschiedlichen Reaktionen von ASC auf LPS bedingen.

Für die weiteren Versuche in dieser Arbeit wurde als Stimulationsstandard LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml für eine Dauer von 4 h festgelegt. Angesichts der bereits erwähnten beschriebenen LPS-Konzentrationen bei Sepsis stellt die Konzentration von 10 ng/ml einen Kompromiss zwischen Plausibilität der Konzentration in vivo sowie maximaler Expressionssteigerung dar. Zudem ist der Unterschied der Expressionssteigerung zwischen den Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml LPS nicht signifikant. Da IL-6 bei der gewählten Konzentration eine stärkere Expressionssteigerung und geringere Standardabweichung als TNF α zeigte, wurde IL-6 als Marker für die qPCR gewählt.

5.2 RNA-Sequenzierung

Gemäß des zuvor erarbeiteten Entzündungsmodells wurde eine ASC-Isolation im Triplet stimuliert, die RNA der stimulierten und nicht-stimulierten Zellen isoliert, bereinigt, qualitätskontrolliert und sequenziert. Es erfolgte eine Differentialanalyse von Kontrolle und Stimulation. Die codierende mRNA wurde einer GSEA unterzogen und annotiert. Ausgewählte lncRNAs wurde mittels qPCR validiert. Dabei wurden solche bevorzugt, für die mehrere Transkripte

detektiert wurden, die besser erforscht sind und daher ein Gensymbol haben oder die aufgrund ihrer räumlichen Nähe zu Genen, die im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen stehen, diese potentiell regulieren können.¹⁰⁷

5.2.1 Codierende Transkripte

Im codierenden Bereich waren insgesamt 357 Gene in ihrer Expression gesteigert und 403 vermindert. In der GSEA der expressionsgesteigerten Gene war der KEGG-Term mit der höchsten Signifikanz Alkoholismus. Liangpunsakul et al. konnten bereits zeigen, dass Alkoholkonsum zu erhöhtem Serum-LPS führt.¹⁰⁸ Ursachen dafür sind unter anderem, dass chronischer Alkoholkonsum zu einer Veränderung des Mikrobioms des Darms führt und es so dort zu einer höheren Produktion von bakteriellen Toxinen kommt.¹⁰⁹ Da Alkohol auch die Permeabilität des Darms steigert, werden die Toxine zudem noch stärker resorbiert.^{109,110}

Weitere Terme expressionsgesteigerter Gene wiesen auf Atherosklerose, Malignome, Diabetes mellitus und Insulinresistenz hin. Für diese Pathologien konnte eine geringgradige, chronische Entzündung als wichtiger pathogenetischer Faktor gefunden werden,¹¹¹ die vermittelt durch Adipositas und Ernährung auftritt und metabolische Inflammation genannt wird.^{112,113} Infolge fettreicher Ernährung konnten gesteigerte Serum-LPS-Spiegel gezeigt werden, was Cani et al. als metabolische Endotoxämie bezeichnen.¹¹⁴ Durch ernährungsbedingte Veränderungen der intestinalen mikrobiellen Besiedlung kommt es zu einer veränderten LPS-Belastung.^{114,115} Die Aufnahme von LPS erfolgt durch intestinale Resorption über Chylomikronen¹¹⁶ und eine erhöhte Permeabilität der Darmwand, welche durch die Wirkung von Nahrungsbestandteilen^{117,118} und die veränderte mikrobielle Besiedlung bedingt sein könnte.^{119,120}

Metabolische Inflammation betrifft viele Gewebe, darunter vorrangig auch das Fettgewebe.¹¹² Es kommt zu einer Infiltration des Fettgewebes mit Monozyten, die zu Makrophagen differenzieren und die im Fettgewebe ansässigen Makrophagen zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine anregen, was zur Insulinresistenz führt.^{121,122} Als weiterer treibender Mechanismus der metabolischen Inflammation wurde lange eine direkte Aktivierung von TLR4 durch lange, gesättigte Fettsäuren wie etwa Palmitat vermutet, da ein Fehlen von TLR4 in vitro zu einer deutlich verminderten Produktion von IL-6 und TNF α nach Stimulation mit langen, gesättigten Fettsäuren führt und Mäuse mit TLR4-knockout gegen die inflammatorische Wirkung der Fettsäuren geschützt sind.¹²³ Neuere Untersuchungen von Makrophagen durch Lancaster et al. konnten jedoch zeigen, dass Palmitat kein direkter TLR4-Agonist ist.¹²⁴ Sie vermuten, dass vermittelt über TLR eine Änderung des Metabolismus der Makrophagen ausgelöst wird, der die Voraussetzung der inflammatorischen Wirkung von Palmitat darstellt, da bei TLR4-knockout durch eine Stimulation anderer TLR-Rezeptoren die inflammatorische Wirkung von Palmitat wiederhergestellt wird. Die Autoren schließen jedoch nicht aus, dass für andere Fettsäuren nicht doch ein direkter Agonismus bestehen könne.

Im Rahmen von Adipositas und metabolischer Inflammation kommt es auch zu Veränderungen von ASC. So konnten Serena et al. bei ASC von DonorInnen mit Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 eine gesteigerte Produktion inflammatorischer Zytokine und verminderte immunmodulatorische Aktivität nachweisen.¹²⁵ Angesichts der beschriebenen Untersuchungsergebnisse kann vermutet werden, dass ASC über TLR4-vermittelte, inflammatorische Signalwege ebenso an der Entstehung und Aufrechterhaltung von metabolischer Inflammation beteiligt sein könnten. Entsprechend interessant ist eine weiterführende Untersuchung der Rolle von lncRNA in diesem Bereich als potentieller Ansatz zur The-

rapie. Es wurden im Zusammenhang mit metabolischer Inflammation bereits diverse lncRNAs beschrieben, jedoch noch nicht bei ASC.¹²⁶

Durch die Stimulation wurden Gene in ihrer Expression gesteigert, die mit Zellmigration und Chemotaxis assoziiert sind, und Gene für Zelladhäsion in ihrer Expression vermindert. Im Rahmen von Regenerationsprozessen, an denen ASC beteiligt sind, wären solche Veränderungen plausibel. In gezielten Untersuchungen zur Migration und Chemotaxis von ASC zeigten sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse: Baek et al. konnten zeigen, dass $\text{TNF}\alpha$, welches auch bei LPS-Stimulation von ASC gebildet wird, die Migration und Chemotaxis von ASC fördert.¹²⁷ Herzmann et al. konnten durch die Stimulation von ASC mit LPS jedoch keine Steigerung der Migration oder Chemotaxis nachweisen.¹²⁸ Für mesenchymale Stamm-/Stromazellen aus anderen Nischen, etwa aus Knochenmark, konnte hingegen eine gesteigerte Migration durch LPS gezeigt werden.¹²⁹ Der tatsächliche Einfluss von LPS auf die Migration ist daher noch unklar, zumal hierzu keine in vivo Untersuchungen vorliegen.

Neben Termen zu Zytokin-Signalwegen sowie infektiösen und inflammatorischen Erkrankungen wurden in der GSEA auch Terme aus dem Bereich Proliferation und Differenzierung gefunden, darunter auch der Wnt-Signalweg. Wnt-Proteine wirken para- oder autokrin durch Bindung an Frizzled-Rezeptoren unter Beteiligung von Co-Rezeptoren wie etwa Lipoprotein-Rezeptor-assoziierten Proteinen.^{130,131} Dadurch kommt es intrazellulär zur Aktivierung des Proteins Dishevelled, welches letztlich den Abbau von β -Catenin verhindert,¹³² das intrazellulär akkumuliert und im Zellkern Transkriptionsfaktoren rekrutieren kann.¹³³ Dieser Signalweg ist der kanonische Wnt-Signalweg. Darüber hinaus gibt es noch nicht-kanonische Wnt-Signalwege, die ihre Effekte unabhängig von β -Catenin vermitteln.¹³³ Funktionell ist β -Catenin relevant in der embryonalen Entwicklung, Stammzellerneuerung und Zelldifferenzierung.^{134,135} In der vorlie-

genden Arbeit war nach LPS-Stimulation die Expression der Wnt-Proteine WNT2 und WNT5A, der Frizzled-Rezeptoren FZD2 und FZD7 sowie des Co-Rezeptors receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2) vermindert. Dieses Ergebnis zeigte sich jedoch nur in der RNA-Sequenzierung und konnte in der qPCR nicht bestätigt werden. WNT2, WNT5A und ROR2 zeigten sich dort, wenn auch nicht signifikant, expressionsgesteigert. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass eine Aktivierung der Wnt-Signalwege, unter anderem auch durch WNT5A,¹³⁶ bei ASC in der Regel zu einer Förderung der osteogenen und Hemmung der adipogenen Differenzierung führt.¹³⁷ Bei LPS-Stimulation von ASC konnten Herzmann et al. sowie Fiedler et al. zeigen, dass es zu einer Förderung der osteogenen und Hemmung der adipogenen Differenzierung kommt sowie zu einer allgemeinen Steigerung der Proliferation.^{138,139} Hinweise auf letzteres ergaben sich auch aus der GSEA in der vorliegenden Arbeit. Der Mechanismus, über den LPS die osteogene Differenzierung fördert, ist zwar über TNF α und NF- κ B erklärbar,¹⁴⁰ aber es ist denkbar, dass dies teilweise auch durch eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch den NF- κ B-Signalweg bedingt ist. Solche Effekte wurden für verschiedenste Zellen, auch ASC, bereits beschrieben, jedoch sind sie sehr zellspezifisch und bedürfen daher einer gezielteren Untersuchung.¹⁴¹

5.2.2 Nicht-codierende Transkripte

Im nicht-codierenden Bereich waren insgesamt 16 lncRNAs expressionsgesteigert und 42 lncRNAs expressionsgemindert. Für die Transkripte H19-202 und H19-203 konnte passend zum Ergebnis der RNA-Sequenzierung eine signifikante Expressionsminderung nach LPS-Stimulation in der qPCR detektiert werden. Die Expression und Funktion von lncRNA sind sehr zellspezifisch.^{142,143} So ist etwa H19 bei der osteogenen Differenzierung von MSC aus dem Knochen-

mark expressionsgesteigert und bei ASC expressionsgemindert.¹⁴⁴ Zudem sind lncRNA meist schlecht evolutionär konserviert.¹⁴⁵ Aufgrund dessen werden im folgenden nur Studien zu lncRNA bei humanen ASC betrachtet,¹⁴⁶ auch wenn H19 bereits bei anderen Zellen im Zusammenhang mit IL-6-Dysregulation beschrieben wurde.¹⁴⁷ Der Mangel eines standardisierten Isolations- und Kultivierungs-Protokoll¹⁴⁸ für ASC erschwert jedoch die Vergleichbarkeit, Reproduktion und Übertragbarkeit der Ergebnisse bei Studien mit ASC. Eine verminderte Expression von H19 ist im Rahmen der adipogenen¹⁴⁹ und osteogenen¹⁴⁴ Differenzierung von ASC beobachtet worden. Hingegen wurde eine gesteigerte Expression bei chondrogener Differenzierung von ASC berichtet.¹⁵⁰ Im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen, vermittelt über LPS und TLR4, wurden die in der vorliegenden Arbeit detektierten lncRNAs bisher nicht beschrieben. Bisher ist PCAT1 als einzige lncRNA bei ASC bekannt, die mit dem TLR-Signalweg direkt assoziiert ist: Yu et al. konnten eine Förderung der osteogenen Differenzierung von ASC durch Expressionssteigerung von TLR4 und Aktivierung des TLR-Signalwegs vermittelt über PCAT1 zeigen.¹⁵¹

Insgesamt zeigten sich bei allen untersuchten nicht-codierenden Transkripten deutliche, teils signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Isolationen. Für einige Isolationen war die Stichprobenzahl jedoch zu gering, um alle Isolationen ausreichend miteinander zu vergleichen. Für lncRNAs wurden bereits deutliche interindividuelle Schwankungen der Expression beschrieben.^{152,153} Darüber hinaus wurden auch interindividuelle Unterschiede der Expressionsprofile von Oberflächenmarkern von ASC beschrieben.¹⁵⁴ Diese könnten auch die Schwankungen der Expression zwischen den Isolationen erklären. So können Unterschiede zwischen den DonorInnen zu den Expressionsunterschieden geführt haben, da etwa das Körpergewicht Einfluss auf die Genexpression hat^{106,155} und auch geschlechtsspezifische Effekte infrage kommen.

Ein weiterer möglicher Einflussfaktor, der in der vorliegenden Arbeit nicht ausreichend berücksichtigt wurde und in zukünftigen Arbeiten untersucht werden könnte, ist der Einfluss der Passage. Die ersten Passagen bei der Kultivierung von ASC können noch Beimengungen anderer Zelltypen aus der Stromalen vaskulären Nische beinhalten.^{148,154,156} Da die Expression von lncRNA sehr zellspezifisch ist,^{142,143} könnte das Fehlen dieser Zellen in späteren Passagen zu einem anderen lncRNA-Expressionsprofil führen. Auch kann sich das Profil der Oberflächenmarker von ASC im Verlauf der Kultivierung ändern,^{148,154,156} womit möglicherweise weitere Änderungen der lncRNA-Expression einhergehen.

Was die Untersuchung neben den bereits genannten Faktoren zusätzlich erschwert, ist das allgemeine eher niedrige Expressionsniveau von lncRNA¹⁴⁶ sowie die schlechte Konservierung der meisten Transkripte.¹⁴⁵ Einzelne, funktionell relevante Transkripte, wie etwa MALAT1, weisen jedoch eine gewisse Konservierung auf.¹⁴⁶ In zukünftigen Untersuchungen könnte versucht werden mehrere Isolationen zu poolen¹⁵⁷ und dann die RNA zu sequenzieren. Auf die Vergleichbarkeit von Alter, Körpergewicht, Morbidität der DonorInnen, Isolationsort des Gewebes und Passage sollte geachtet werden. So kann man auch den Einfluss dieser Faktoren auf die Expression untersuchen. Da in dieser Arbeit viele dieser donorspezifischen Daten nicht vorlagen, konnte nicht darauf eingegangen werden. In zukünftigen Untersuchungen sollten diese Daten gezielt bei der Akquirierung von DonorInnen erhoben werden.

5.3 Transfektion

Aufgrund der erfolgreichen Validierung und der im vorherigen Kapitel aufgeführten funktionellen Relevanz bei ASC wurde H19 zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Durch Transfektion mit siRNA erfolgte ein knockdown von H19. Als Transfektionsreagenz wurde PEI genutzt. Verglichen wurden unstimulierte

Zellen als Kontrolle, LPS-stimulierte Zellen, transfizierte Zellen, transfizierte und anschließend LPS-stimulierte Zellen sowie mit einer Kontroll-siRNA transfizierte Zellen hinsichtlich der Expression von IL-6 sowie der lncRNA-Transkripte H19-202, H19-203 und NEAT1-202.

Park et al. konnten bereits zeigen, dass PEI für ASC als Transfektionsreagenz gut geeignet ist. Es ist in Konzentrationen vergleichbar mit denen, die in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden, nur wenig toxisch und ohne signifikante Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Zellen.¹⁵⁸ Die Effektivität der Transfektion hätte jedoch durch Transfektion von ASC in Suspension sowie Konjugation von PEI mit einem nukleären Lokalisationssignal eventuell noch gesteigert werden können.¹⁵⁸ Auch hätten unterschiedliche Konzentrationen und Verhältnisse von PEI und siRNA sowie unterschiedliche Inkubationsdauern getestet werden können.

Die alleinige Transfektion zeigte eine geringe Steigerung der IL-6 Proteinsynthese im ELISA sowie geringe Expressionssteigerung von IL-6, die knapp nicht signifikant war ($p = 0,0676$). Zwar zeigte sich eine höhere IL-6-mRNA-Expression und -Proteinsynthese nach LPS-Stimulation bei vorheriger Transfektion im Vergleich zu alleiniger LPS-Stimulation, jedoch war der Unterschied nicht signifikant.

Judge et al. konnten zeigen, dass PEI und siRNA gemeinsam eine sequenzabhängige, proinflammatorische Wirkung auf mononukleäre Zellen haben und zur Produktion von IL-6, TNF α und Interferon- α führen.¹⁵⁹ An embryonalen Nierenzellen konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus siRNA und PEI TLR3, TLR5 und TLR7 aktivieren kann.¹⁶⁰ Funktionelle TLR3-Rezeptoren wurden auf ASC nachgewiesen sowie die Expression von mRNA für TLR5 und TLR7.⁹⁴ Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte sind daher möglicherweise auf eine allgemeine proinflammatorische Wirkung des Transfektions-

prozesses zurückzuführen und unabhängig vom H19-knockdown. Um dies auszuschließen, wäre eine Untersuchung von IL-6 bei alleiniger Behandlung von ASC mit siRNA bzw. PEI, eine Transfektion mit Kontroll-siRNA und/oder Anwendung von TLR-Antagonisten mit Ausnahme von TLR4 sinnvoll gewesen. Über die Auswirkungen der Transfektion auf die IL-6-Expression hinaus ist es ebenso interessant, die Auswirkungen auf weitere Zytokine sowie die Bestandteile des TLR4-Signalwegs weiter zu untersuchen, wobei letzteres eine mögliche mechanistische Erklärung der Wirkung des knockdowns ergeben könnte. Auch könnten die bereits angesprochenen donorspezifischen Eigenschaften von ASC¹⁵⁵ sowie Einflüsse der Passage^{148,154,156} in weiteren Arbeiten zusätzlich untersucht werden. Neben dem Einfluss des knockdowns könnte dann auch der Einfluss einer artifiziellen Expressionssteigerung untersucht werden.

Zwar wurde bei allen untersuchten Stimulationsbedingungen für die Gesamtheit sowie die einzelnen Isolationen – mit Ausnahme der Isolation 98 als Ausreißer mit einer Stichprobenzahl von 1 – eine verminderte Expression der Transkripte H19-202 und H19-203 beobachtet, jedoch war diese nur bei der Isolation 97 für H19-203 signifikant. Dort zeigte die LPS-Stimulation mit vorheriger Transfektion ähnlich zum Ergebnis für IL-6 die größte Expressionsänderung, auch wenn die Unterschiede nicht signifikant waren. Zwischen den Stimulationsbedingungen fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von H19-202 und H19-203 in der Gesamtheit oder bei einzelnen Isolationen. Die Stichprobengröße der Kontroll-Transfektion war zu gering und die gemessenen Schwankungen zu groß um den Einfluss des reinen Transfektionsprozesses auf die Expression von H19-202 und H19-203 adäquat zu beurteilen.

Für NEAT1-202 zeigte sich für die untersuchten Isolationen wie bereits in den vorherigen Versuchen eine geringgradige Expressionssteigerung bei LPS-Stimulation. Der H19-knockdown führte je nach Isolation zu einer Expressionsminde-

rung oder -steigerung. Die Kombination aus H19-knockdown und anschließender LPS-Stimulation führte jedoch in allen Fällen zu einer Expressionssteigerung. Alle Ergebnisse bezüglich NEAT1-202 waren nicht signifikant. Ein sicherer Effekt des H19-knockdowns auf NEAT1-202 ist aus den vorliegenden Daten damit nicht ableitbar.

Wie bereits die erhöhte IL-6-Synthese könnte auch die noch weiter verminderte Expression von H19-203 bei Isolation 97 lediglich durch eine weitere Aktivierung von TLR-Rezeptoren durch den alleinigen Prozess der Transfektion und nicht den knockdown selbst bedingt sein.^{94,160} Entsprechend sind weitere Untersuchungen hinsichtlich der alleinigen Wirkung von siRNA, PEI sowie die Kombination mit TLR-Antagonisten mit Ausnahme von TLR4 wünschenswert. LncRNAs können ihre Wirkung sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma entfalten.¹⁶¹ Der knockdown mittels siRNA-Transfektion wirkt auf nukleär lokalisierte RNA jedoch teils ineffizient.¹⁶² Sofern H19 bei ASC im Rahmen des TLR4-Signalwegs auch auf nukleärer Ebene relevant ist, wurden diese Effekte bei der in der vorliegenden Arbeit erfolgten Transfektion nicht ausreichend erfasst. Eine Alternative zur Transfektion mittels PEI ist ein CRISPR-basiertes System wie von Gilbert et al. beschrieben.¹⁶³ Zusätzlich könnte eine weitere Untersuchung der Interaktion von lncRNA und Proteinen erfolgen beispielsweise mittels high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation (HITS-CLIP).¹⁶⁴

Bisher wurde bei ASC nur in drei anderen Studien der Effekt eines H19-knockdowns untersucht.^{144,149,165} Alle erfolgten mit siRNA und Lipofectamin als Transfektionsreagenz. Untersucht wurde in allen drei Studien die Auswirkung auf die Differenzierung von ASC. Der H19-knockdown führte zur Steigerung der adipogenen^{149,165} bzw. osteogenen¹⁴⁴ Differenzierung. Inflammatorische Prozesse wurden bisher nicht untersucht.

5.4 Conclusio

Zusammenfassend konnte ein Entzündungsmodell mit ASC und LPS in vitro etabliert werden. Anhand dessen wurde H19 als potentiell an der TLR4-vermittelten Entzündungsreaktion beteiligte lncRNA detektiert. Es ergaben sich Hinweise, dass eine verminderte Expression von H19 möglicherweise den TLR4-Signalweg verstärkt, jedoch sind weitere Untersuchungen nötig, um Rückschlüsse auf etwaige Mechanismen zu ziehen.

Auf der Basis dieser Arbeit könnten nun weitere lncRNAs untersucht werden, vor allem im Hinblick auf den Einfluss donorspezifischer Eigenschaften wie etwa Alter, Geschlecht, Gewicht oder Isolationsort der ASC. Weitere Untersuchungen sind auch nötig, um die genauen Einflüsse und Mechanismen von H19 hinsichtlich des TLR4-Signalwegs zu verstehen. Dabei können etwa microRNA und potentielle codierende Funktionen von lncRNA eine Rolle spielen,¹⁶¹ die hier nicht untersucht wurden. Auch eine Erweiterung des Modells mit Hinblick auf Chronifizierung und Terminierung von Entzündung ist wünschenswert.

6 Zusammenfassung

Entzündungsprozesse sind essentiell zur Abwehr exogener und endogener Pathogene sowie bei der Geweberegeneration. Ihre Dysregulation ist an unzähligen Krankheitsprozessen beteiligt. Die Auslösung einer Entzündung ist besonders gut untersucht bei Toll-like Rezeptoren, die Strukturen von Mikroorganismen erkennen können und durch Signalkaskaden beispielsweise NF- κ B aktivieren. LncRNAs regulieren die Genexpression und wurden dabei bereits im Rahmen von Entwicklung, Proliferation, Karzinogenese und Entzündung nachgewiesen. ASC sind für die regenerative Medizin aufgrund ihrer einfachen Gewinnung und ihrer Differenzierbarkeit höchst interessant. Zudem haben sie einen Einfluss auf inflammatorische Prozesse. Daher könnte es relevant sein, welche Rolle lncRNAs während Entzündungsprozessen bei ASC spielen. Daraus könnten sich auch potentielle Ansätze für Diagnostik und Therapie entwickeln. Es wurde ein Entzündungsmodell mit ASC etabliert, welche mit Bakterientoxinen stimuliert wurden. Das Modell wurde mit einem im nephrologischen Labor etablierten Modell mit renalen Epithelzellen hinsichtlich der Entzündungsantwort verglichen. Diese Entzündungsantwort wurde anhand der Zytokinproduktion auf mRNA- und Proteinebene quantifiziert. Anschließend erfolgte eine RNA-Sequenzierung und Vergleich der RNA bei stimulierten und nicht-stimulierten ASC. Die detektierten veränderten lncRNAs wurden mittels qPCR validiert. Zuletzt wurde durch knockdown einer ausgewählten lncRNA versucht, Einfluss auf die Entzündungsprozesse zu nehmen.

Die vorgelegte Arbeit zeigt deutlich, dass ASC eine stärkere Entzündungsantwort als renale Epithelzellen zeigen. Als Mittelweg aus maximaler Entzündungsantwort und realistischen Stimulationsbedingungen wurde eine Stimulation mit 10 ng/ml LPS für 4 h gewählt. Nach der RNA-Sequenzierung zeigte die funktionelle Analyse der veränderten codierenden RNA Hinweise auf Entzün-

dungsprozesse, Zellmigration, Chemotaxis, Differenzierung, Proliferation sowie Alkoholismus, Atherosklerose, Diabetes mellitus und Insulinresistenz. Diese Ergebnisse lassen sich mit dem aktuellen Stand der Forschung in Einklang bringen und legen die Bedeutung von Entzündung und ASC in diesen Bereichen dar. Bei den lncRNAs ergab die Sequenzierung insgesamt 48 expressionsveränderte Transkripte, H19 konnte hierbei erfolgreich validiert werden. Diese lncRNA war im Rahmen der LPS-induzierten Entzündung expressionsvermindert. Aufgrund donorspezifischer Einflussfaktoren auf die Genexpression bei ASC wie Körpergewicht und Morbidität sowie allgemeiner interindividueller Schwankung der Expression von lncRNA sind aber weitere Untersuchungen zur Detektion relevanter lncRNAs erforderlich. Die Transfektionsversuche zeigten Hinweise darauf, dass der H19-knockdown möglicherweise die LPS-vermittelte Entzündungsantwort bei ASC verstärkt.

Zusammenfassend wurde ein Modell zur Untersuchung von lncRNA bei LPS-induzierter Inflammation in ASC etabliert sowie im Rahmen dessen H19 als relevante lncRNA detektiert, die den Ausgangspunkt für weitere Forschung darstellt.

7 Abstract

Inflammation is essential for the defense against exogenous and endogenous pathogens and tissue regeneration. Dysregulation of inflammation is part of numerous diseases. The initiation of inflammation was heavily researched on toll like receptors, which sense parts of microorganisms and activate NF- κ B through their signaling pathways. LncRNAs regulate gene expression and have been observed in the context of development, proliferation, carcinogenesis and inflammation. ASC are of interest for regenerative medicine, as they are easy to harvest, able to differentiate into multiple cell types and relevant for inflammation. Therefore the role of lncRNAs in inflammation of ASC is interesting, as they may offer potential for diagnostic and therapeutic applications.

An inflammation model with ASC has been established, in which the cells were stimulated with bacterial toxins. This model was compared with an already in the nephrological laboratory established cell model with renal epithelial cells regarding the inflammatory response. The latter was quantified via cytokine production on mRNA- and protein-level. The RNA of stimulated and unstimulated ASC was compared via RNA-sequencing. The detected differentially expressed lncRNA was validated via qPCR. A knockdown of a selected lncRNA was performed via transfection with siRNA to influence inflammation.

This work presented here demonstrated that ASC show a stronger inflammatory response than ciPTC. As a good balance between maximum inflammatory response and realistic stimulation conditions, a stimulation with 10 ng/ml LPS for 4 hours was chosen for further experiments. The functional analysis of the differentially expressed coding RNA detected by RNA-sequencing showed relevance of the LPS-mediated signaling in ASC for inflammation, cell migration, chemotaxis, differentiation, proliferation, alcoholism, atherosclerosis, diabetes and insulin resistance. To all these processes and diseases a link to LPS-mediated in-

flammation has been described. A total of 48 non-coding transcripts were differentially expressed as detected by RNA-sequencing. H19, which was shown to be downregulated via RNA-sequencing, was successfully validated by qPCR. Because of donor specific factors on gene expression like body weight and morbidity as well as a generally interindividually fluctuation of expression of lncRNA more research is necessary to discover further relevant lncRNA. The transfection hinted that knockdown of H19 may fortify the LPS-mediated inflammatory response of ASC.

In summary, a model for LPS-mediated inflammation of ASC for research on lncRNA was established and in this context H19 was detected as relevant lncRNA, which serves as the basis for further research.

Anhang

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: KEGG-Terme expressionsgesteigerter Transkripte (Top 20).....	79
Tab. 2: KEGG-Terme expressionsverminderter Transkripte.....	80
Tab. 3: GO-Terme biologischer Prozesse für expressionsgesteigerte Transkripte (Top 20)	80
Tab. 4: GO-Terme biologischer Prozesse für expressionsverminderte Transkripte.....	81
Tab. 5: GO-Terme molekularer Funktionen expressionsgesteigerter Transkripte.....	82
Tab. 6: GO-Terme molekularer Funktionen expressionsverminderter Transkripte.....	82
Tab. 7: lncRNA mit gesteigerter Expression unter LPS-Stimulation von ASC.....	82
Tab. 8: lncRNA mit verminderter Expression unter LPS-Stimulation von ASC.....	83

Tab. 1: KEGG-Terme expressionsgesteigerter Transkripte (Top 20, sortiert nach q-Wert)

KEGG-Terme	p-Wert	q-Wert	Odds Ratio
Alcoholism	<0,001	<0,001	11,413
TNF signaling pathway	<0,001	<0,001	14,593
Systemic lupus erythematosus	<0,001	<0,001	12,228
IL-17 signaling pathway	<0,001	<0,001	13,853
Rheumatoid arthritis	<0,001	<0,001	11,292
Transcriptional misregulation in cancer	<0,001	<0,001	6,963
Influenza A	<0,001	<0,001	6,764
Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	<0,001	<0,001	6,155
NF-kappa B signaling pathway	<0,001	<0,001	9,015
NOD-like receptor signaling pathway	<0,001	<0,001	6,050
Human cytomegalovirus infection	<0,001	<0,001	5,304
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	<0,001	<0,001	8,495
Legionellosis	<0,001	<0,001	12,551
Cytokine-cytokine receptor interaction	<0,001	<0,001	4,435
Antigen processing and presentation	<0,001	<0,001	9,430
Chemokine signaling pathway	<0,001	<0,001	5,250
Salmonella infection	<0,001	<0,001	8,295
Epstein-Barr virus infection	<0,001	<0,001	4,935
Proteoglycans in cancer	<0,001	<0,001	4,935

KEGG-Terme	p-Wert	q-Wert	Odds Ratio
Viral carcinogenesis	<0,001	<0,001	4,935

Tab. 2: KEGG-Terme expressionsverminderter Transkripte (sortiert nach q-Wert)

KEGG-Terme	p-Wert	q-Wert	Odds Ratio
ECM-receptor interaction	<0,001	<0,001	11,269
Focal adhesion	<0,001	<0,001	5,997
Human papillomavirus infection	<0,001	<0,001	4,573
Protein digestion and absorption	<0,001	<0,001	8,450
PI3K-Akt signaling pathway	<0,001	<0,001	3,351
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	<0,001	0,003	6,181
Phagosome	<0,001	0,008	3,872
Dilated cardiomyopathy (DCM)	0,001	0,013	4,762
Cell adhesion molecules (CAMs)	0,001	0,017	3,668
Wnt signaling pathway	0,001	0,030	3,344
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	0,002	0,032	4,423

Tab. 3: GO-Terme biologischer Prozesse für expressionsgesteigerte Transkripte (Top 20, sortiert nach q-Wert)

GO-Terme biologischer Prozesse	p-Wert	q-Wert	Odds Ratio
cytokine-mediated signaling pathway	<0,001	<0,001	6,289
cellular response to cytokine stimulus	<0,001	<0,001	4,963
interferon-gamma-mediated signaling pathway	<0,001	<0,001	15,620
regulation of cell proliferation	<0,001	<0,001	3,619
positive regulation of cell proliferation	<0,001	<0,001	4,482
cellular response to interferon-gamma	<0,001	<0,001	9,170
positive regulation of cellular process	<0,001	<0,001	4,015
positive regulation of leukocyte migration	<0,001	<0,001	20,294
negative regulation of apoptotic process	<0,001	<0,001	3,720
positive regulation of cytokine production	<0,001	<0,001	5,110
regulation of cell migration	<0,001	<0,001	4,099

GO-Terme biologischer Prozesse	p-Wert	q-Wert	Odds Ratio
cellular response to lipopolysaccharide	<0,001	<0,001	7,774
negative regulation of cell proliferation	<0,001	<0,001	3,717
response to lipopolysaccharide	<0,001	<0,001	5,645
regulation of leukocyte chemotaxis	<0,001	<0,001	17,061
response to molecule of bacterial origin	<0,001	<0,001	7,146
cellular response to type I interferon	<0,001	<0,001	9,046
type I interferon signaling pathway	<0,001	<0,001	9,046
negative regulation of signal transduction in absence of ligand	<0,001	<0,001	19,735
negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand	<0,001	<0,001	19,735

Tab. 4: GO-Terme biologischer Prozesse für expressionsverminderte Transkripte (sortiert nach q-Wert)

GO-Terme biologischer Prozesse	p-Wert	q-Wert	Odds Ratio
extracellular matrix organization	<0,001	<0,001	10,944
collagen fibril organization	<0,001	<0,001	40,794
protein complex subunit organization	<0,001	<0,001	20,380
regulation of cell migration	<0,001	<0,001	3,791
collagen metabolic process	<0,001	0,001	35,158
regulation of cell proliferation	<0,001	0,002	2,465
skeletal system development	<0,001	0,002	4,878
antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	<0,001	0,004	13,447
skin development	<0,001	0,005	5,911
sprouting angiogenesis	<0,001	0,005	9,345
negative regulation of cell migration	<0,001	0,006	4,971
eye morphogenesis	<0,001	0,006	16,400
platelet degranulation	<0,001	0,006	4,838
positive regulation of cell migration	<0,001	0,006	3,639
regulated exocytosis	<0,001	0,006	4,392
protein hydroxylation	<0,001	0,009	24,548

GO-Terme biologischer Prozesse	p-Wert	q-Wert	Odds Ratio
negative regulation of cellular process	<0,001	0,011	2,480
regulation of cytoskeleton organization	<0,001	0,015	5,182
cellular protein metabolic process	<0,001	0,015	2,512
positive regulation of glucose import	<0,001	0,015	11,711

Tab. 5: GO-Terme molekularer Funktionen expressionsgesteigerter Transkripte (sortiert nach q-Wert)

GO-Terme molekularer Funktionen	p-Wert	q-Wert	Odds Ratio
CXCR chemokine receptor binding	<0,001	<0,001	39,266
cytokine activity	<0,001	<0,001	6,584
integrin binding	<0,001	<0,001	8,297
chemokine activity	<0,001	<0,001	11,826
chemokine receptor binding	<0,001	<0,001	10,959
collagen binding	<0,001	<0,001	10,210
growth factor receptor binding	<0,001	<0,001	6,875

Tab. 6: GO-Terme molekularer Funktionen expressionsverminderter Transkripte (sortiert nach q-Wert)

GO-Terme molekularer Funktionen	p-Wert	q-Wert	Odds Ratio
collagen binding	<0,001	<0,001	18,524
platelet-derived growth factor binding	<0,001	<0,001	62,083
integrin binding	<0,001	<0,001	7,304
protein-lysine 6-oxidase activity	<0,001	0,015	51,354

Tab. 7: lncRNA mit gesteigerter Expression unter LPS-Stimulation von ASC

Ensembl Transkript ID	Ensembl Transkript Name	β-Wert	SD
ENST00000618589.1	AC245014.3-201	3,25	0,71
ENST00000445745.6	PAX8-AS1-205	3,18	0,91
ENST00000456917.1	MIR155HG-201	2,69	0,63
ENST00000634535.1	AL162456.1-201	2,54	0,78

ENST00000568686.1	AC006058.1-201	2,16	0,38
ENST00000442318.1	LEMD1-DT-201	1,94	0,66
ENST00000362077.4	AP000317.2-201	1,67	0,32
ENST00000643779.1	AC016831.6-205	1,48	0,44
ENST00000568189.5	AC140479.4-201	1,47	0,23
ENST00000432045.6	AC016831.1-201	1,27	0,20
ENST00000606154.1	Z97200.1-201	1,19	0,41
ENST00000512873.1	LINC02261-201	1,15	0,33
ENST00000294715.6	LINC02802-201	1,14	0,39
ENST00000467530.5	AC092807.3-203	1,10	0,30
ENST00000603468.1	AC009549.1-201	1,08	0,37
ENST00000570269.2	AC093010.2-201	1,03	0,11

Tab. 8: lncRNA mit verminderter Expression unter LPS-Stimulation von ASC

Ensembl Transkript ID	Ensembl Transkript Name	β -Wert	SD
ENST00000414790.6	H19-203	-4,66	1,24
ENST00000458653.5	ZFAS1-207	-4,26	1,17
ENST00000648996.1	LINC01500-205	-3,76	0,63
ENST00000391359.2	AC003035.1-201	-3,55	1,00
ENST00000392688.7	FLG-AS1-202	-3,43	0,68
ENST00000414504.6	ATXN8OS-201	-3,16	0,51
ENST00000631128.1	AC217775.1-201	-3,08	0,72
ENST00000650631.1	AL135926.1-201	-3,01	0,45
ENST00000447298.2	H19-211	-2,94	0,63
ENST00000441316.2	L3MBTL2-AS1-201	-2,81	0,74
ENST00000442037.5	H19-210	-2,61	0,49
ENST00000555889.1	AL355097.1-201	-2,57	0,63
ENST00000445174.5	LINC00607-205	-2,56	0,69
ENST00000647677.1	AC026991.2-201	-2,49	0,70

Ensembl Transkript ID	Ensembl Transkript Name	β-Wert	SD
ENST00000478845.2	AC037198.1-201	-2,44	0,41
ENST00000398832.2	AC116407.1-201	-2,42	0,43
ENST00000526036.1	AP001372.2-201	-2,20	0,73
ENST00000483289.2	AC008040.1-202	-2,20	0,13
ENST00000412788.5	H19-202	-2,12	0,16
ENST00000641315.1	AC079781.5-203	-2,12	0,14
ENST00000566733.2	AL590004.3-201	-2,09	0,44
ENST00000469754.3	DLEU1-212	-2,09	0,65
ENST00000642089.1	SAMMSON-226	-2,03	0,67
ENST00000590628.1	AC006504.5-205	-1,86	0,60
ENST00000578585.1	AC126365.1-201	-1,84	0,11
ENST00000565113.5	DNAAF4-CCPG1-201	-1,79	0,09
ENST00000625474.1	TGFB2-OT1-201	-1,79	0,61
ENST00000501122.2	NEAT1-202	-1,68	0,09
ENST00000625883.2	LINC00632-206	-1,67	0,10
ENST00000528549.1	TBX5-AS1-201	-1,65	0,33
ENST00000444125.2	LINC01503-204	-1,63	0,43
ENST00000457356.9	MSC-AS1-201	-1,62	0,18
ENST00000422304.1	POLR2J4-201	-1,58	0,25
ENST00000561521.1	LINC00662-201	-1,58	0,51
ENST00000423943.2	LINC01133-201	-1,56	0,31
ENST00000618256.1	AC092111.1-201	-1,55	0,32
ENST00000648347.1	LINC00632-211	-1,51	0,17
ENST00000295549.9	LINC01116-201	-1,45	0,39
ENST00000620266.1	AC005332.6-201	-1,33	0,12
ENST00000514265.1	AC078850.1-201	-1,29	0,27
ENST00000500949.6	OIP5-AS1-201	-1,29	0,09
ENST00000648819.1	ANAPC1P2-202	-1,09	0,27

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

Untersuchung von long non-coding RNA im Entzündungsmodell mit mesenchymalen Stamm-/Stromazellen

in dem Zentrum der Inneren Medizin, Medizinische Klinik 4 (Nephrologie) unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Patrick C. Baer mit Unterstützung durch Dr. med. Benjamin Koch und Sandra Fay 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.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. phil. nat. Patrick C. Baer sowie den LabormitarbeiterInnen Dr. med. Benjamin F. Koch und Sandra Fay für die gute Betreuung und enge Zusammenarbeit danken. Dabei möchte ich Dr. med. Benjamin F. Koch ganz besonders herzlich für exzellente Anleitung im Labor sowie sein unermüdliches Feedback danken.

Dank gilt auch meiner Mutter Regina Weck, meinem Vater Michael Züling, meinem Bruder Kevin Weck, meinen Paten Klaus und Birgit Schultes sowie meiner Freundin Lea Littmann für ihre fortwährende Unterstützung während meiner schulischen und universitären Laufbahn, meiner Promotion und darüber hinaus.

Zuletzt sei Constanze Kusch-Plewe stellvertretend für die Kplus Gruppe GmbH gedankt für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums.

Literaturverzeichnis

- 1 Riede U-N, Werner M, eds. Allgemeine und Spezielle Pathologie: Mit 50 Fallberichten. 2., überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2017. Springer-Lehrbuch.
- 2 Ruslan Medzhitov. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-435. doi:10.1038/nature07201.
- 3 Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1191-1197. doi:10.1038/ni1276.
- 4 Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:99-126. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456.
- 5 Cronstein BN, Terkeltaub R. The inflammatory process of gout and its treatment. *Arthritis Res Ther*. 2006;8 Suppl 1(Suppl 1):S3. doi:10.1186/ar1908.
- 6 Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-874. doi:10.1038/nature01323.
- 7 Oppenheim JJ, de Yang. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(4):359-365. doi:10.1016/j.coi.2005.06.002.
- 8 Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022.
- 9 de Yang, Han Z, Oppenheim JJ. Alarmins and immunity. *Immunol Rev*. 2017;280(1):41-56. doi:10.1111/imr.12577.
- 10 Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011;30(1):16-34. doi:10.3109/08830185.2010.529976.
- 11 Kopp A, Buechler C, Neumeier M, et al. Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modula-

- tes cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes. *Obesity* (Silver Spring). 2009;17(4):648-656. doi:10.1038/oby.2008.607.
- 12 Shigeoka AA, Kambo A, Mathison JC, et al. Nod1 and nod2 are expressed in human and murine renal tubular epithelial cells and participate in renal ischemia reperfusion injury. *The Journal of Immunology*. 2010;184(5):2297-2304. doi:10.4049/jimmunol.0903065.
 - 13 Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373-384. doi:10.1038/ni.1863.
 - 14 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015.
 - 15 Sukhithasri V, Nisha N, Biswas L, Anil Kumar V, Biswas R. Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. *Microbiological Research*. 2013;168(7):396-406. doi:10.1016/j.micres.2013.02.005.
 - 16 Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:709-760. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842.
 - 17 Adib-Conquy M, Scott-Algara D, Cavaillon J-M, Souza-Fonseca-Guimaraes F. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunology and Cell Biology*. 2014;92(3):256-262. doi:10.1038/icb.2013.99.
 - 18 Gilleron M, Quesniaux VFJ, Puzo G. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and *mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. *J Biol Chem*. 2003;278(32):29880-29889. doi:10.1074/jbc.M303446200.

- 19 Taghavi M, Khosravi A, Mortaz E, Nikaein D, Athari SS. Role of pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) in immune responses to fungal infections. *European Journal of Pharmacology*. 2017;808:8-13. doi:10.1016/j.ejphar.2016.11.013.
- 20 Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev*. 2004;201(1):9-25. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00174.x.
- 21 Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 1999;189(11):1777-1782. doi:10.1084/jem.189.11.1777.
- 22 Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*. 2002;3(7):667-672. doi:10.1038/ni809.
- 23 Wang Y, Liu L, Davies DR, Segal DM. Dimerization of Toll-like receptor 3 (TLR3) is required for ligand binding. *J Biol Chem*. 2010;285(47):36836-36841. doi:10.1074/jbc.M110.167973.
- 24 Jin MS, Kim SE, Heo JY, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 2007;130(6):1071-1082. doi:10.1016/j.cell.2007.09.008.
- 25 Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018;281(1):8-27. doi:10.1111/imr.12621.
- 26 Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13766-13771. doi:10.1073/pnas.250476497.

- 27 O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):353-364. doi:10.1038/nri2079.
- 28 O'Neill LAJ, Fitzgerald KA, Bowie AG. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends in Immunology*. 2003;24(6):286-289. doi:10.1016/S1471-4906(03)00115-7.
- 29 Panneerselvam P, Ding JL. Beyond TLR Signaling—The Role of SARM in Antiviral Immune Defense, Apoptosis & Development. *Int Rev Immunol*. 2015;34(5):432-444. doi:10.3109/08830185.2015.1065826.
- 30 Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Seminars in Immunology*. 2007;19(1):24-32. doi:10.1016/j.smim.2006.12.004.
- 31 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*. 2002;420(6913):324-329. doi:10.1038/nature01182.
- 32 Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*. 2002;420(6913):329-333. doi:10.1038/nature01180.
- 33 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003;301(5633):640-643. doi:10.1126/science.1087262.
- 34 Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, Akashi-Takamura S, Miyake K. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;368(1):94-99. doi:10.1016/j.bbrc.2008.01.061.
- 35 Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. *Immunity*. 1999;11(1):115-122. doi:10.1016/S1074-7613(00)80086-2.

- 36 Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*. 2001;167(10):5887-5894. doi:10.4049/jimmunol.167.10.5887.
- 37 Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25(51):6680-6684. doi:10.1038/sj.onc.1209954.
- 38 M S Hayden, A P West, S Ghosh. NF- κ B and the immune response. *Oncogene*. 2006;25(51):6758-6780. doi:10.1038/sj.onc.1209943.
- 39 Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001;22(2):153-183. doi:10.1210/edrv.22.2.0428.
- 40 Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, Calin GA. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? *Oncogene*. 2012;31(43):4577-4587. doi:10.1038/onc.2011.621.
- 41 Struhl K. Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nature structural & molecular biology*. 2007;14(2):103-105. doi:10.1038/nsmb0207-103.
- 42 Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*. 1996;379(6561):131-137. doi:10.1038/379131a0.
- 43 Grote P, Wittler L, Hendrix D, et al. The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Dev Cell*. 2013;24(2):206-214. doi:10.1016/j.devcel.2012.12.012.
- 44 Marahrens Y, Panning B, Dausman J, Strauss W, Jaenisch R. Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes Dev*. 1997;11(2):156-166. doi:10.1101/gad.11.2.156.

- 45 Wu T, Du Y. LncRNAs: From Basic Research to Medical Application. *Int J Biol Sci.* 2017;13(3):295-307. doi:10.7150/ijbs.16968.
- 46 Kung JTY, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics.* 2013;193(3):651-669. doi:10.1534/genetics.112.146704.
- 47 Tsai M-C, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science.* 2010;329(5992):689-693. doi:10.1126/science.1192002.
- 48 Espinoza CA, Allen TA, Hieb AR, Kugel JF, Goodrich JA. B2 RNA binds directly to RNA polymerase II to repress transcript synthesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(9):822-829. doi:10.1038/nsmb812.
- 49 Noh JH, Kim KM, McClusky WG, Abdelmohsen K, Gorospe M. Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018;9(3):e1471. doi:10.1002/wrna.1471.
- 50 Romero-Barrios N, Legascue MF, Benhamed M, Ariel F, Crespi M. Splicing regulation by long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(5):2169-2184. doi:10.1093/nar/gky095.
- 51 Lu H, He Y, Lin L, et al. Long non-coding RNA MALAT1 modulates radiosensitivity of HR-HPV+ cervical cancer via sponging miR-145. *Tumor Biol.* 2016;37(2):1683-1691. doi:10.1007/s13277-015-3946-5.
- 52 Prensner JR, Iyer MK, Balbin OA, et al. Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression. *Nat Biotechnol.* 2011;29(8):742-749. doi:10.1038/nbt.1914.
- 53 Tano K, Mizuno R, Okada T, et al. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS Letters.* 2010;584(22):4575-4580. doi:10.1016/j.febslet.2010.10.008.

- 54 Luo Q, Chen Y. Long noncoding RNAs and Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*. 2016;11:867-872. doi:10.2147/CIA.S107037.
- 55 Johnson R. Long non-coding RNAs in Huntington's disease neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*. 2012;46(2):245-254. doi:10.1016/j.nbd.2011.12.006.
- 56 Uchida S, Dimmeler S. Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Circ Res*. 2015;116(4):737-750. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.302521.
- 57 Liu M, Li W, Song F, Zhang L, Sun X. Silencing of lncRNA MIAT alleviates LPS-induced pneumonia via regulating miR-147a/NKAP/NF- κ B axis. *Aging (Albany NY)*. 2020;12. doi:10.18632/aging.202284.
- 58 Agarwal S, Vierbuchen T, Ghosh S, et al. The long non-coding RNA LUCAT1 is a negative feedback regulator of interferon responses in humans. *Nat Commun*. 2020;11(1):6348. doi:10.1038/s41467-020-20165-5.
- 59 Kapranov P, Cheng J, Dike S, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*. 2007;316(5830):1484-1488. doi:10.1126/science.1138341.
- 60 Frith MC, Bailey TL, Kasukawa T, et al. Discrimination of non-protein-coding transcripts from protein-coding mRNA. *RNA Biology*. 2006;3(1):40-48. doi:10.4161/rna.3.1.2789.
- 61 Hartford CCR, Lal A. When Long Noncoding Becomes Protein Coding. *Mol Cell Biol*. 2020;40(6). doi:10.1128/MCB.00528-19.
- 62 Candeias MM, Malbert-Colas L, Powell DJ, et al. P53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nat Cell Biol*. 2008;10(9):1098-1105. doi:10.1038/ncb1770.
- 63 Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009;10(3):155-159. doi:10.1038/nrg2521.

- 64 Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015;35(2). doi:10.1042/BSR20150025.
- 65 Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran.* 2017;55(1):6-23.
- 66 da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science.* 2006;119(Pt 11):2204-2213. doi:10.1242/jcs.02932.
- 67 Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem cells international.* 2012;2012:812693. doi:10.1155/2012/812693.
- 68 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905.
- 69 Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007;100(9):1249-1260. doi:10.1161/01.RES.0000265074.83288.09.
- 70 Timper K, Seboek D, Eberhardt M, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2006;341(4):1135-1140. doi:10.1016/j.bbrc.2006.01.072.
- 71 Radtke C, Schmitz B, Spies M, Kocsis JD, Vogt PM. Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. *Int J Dev Neurosci.* 2009;27(8):817-823. doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.08.006.

- 72 Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol.* 2007;212(3):702-709. doi:10.1002/jcp.21068.
- 73 Hundepool CA, Nijhuis THJ, Mohseny B, Selles RW, Hovius SER. The effect of stem cells in bridging peripheral nerve defects: a meta-analysis. *J Neurosurg.* 2014;121(1):195-209. doi:10.3171/2014.4.JNS131260.
- 74 Sukho P, Cohen A, Hesselink JW, Kirpensteijn J, Verseijden F, Bastiaansen-Jenniskens YM. Adipose Tissue-Derived Stem Cell Sheet Application for Tissue Healing In Vivo: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2018;24(1):37-52. doi:10.1089/ten.TEB.2017.0142.
- 75 Lee W-S, Kim HJ, Kim K-I, Kim GB, Jin W. Intra-Articular Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Phase IIb, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Stem Cells Transl Med.* 2019;8(6):504-511. doi:10.1002/sctm.18-0122.
- 76 Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2005;330(1):142-150. doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.141.
- 77 Wilmer MJ, Saleem MA, Masereeuw R, et al. Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters. *Cell Tissue Res.* 2010;339(2):449-457. doi:10.1007/s00441-009-0882-y.
- 78 Wirth M, Fritsche P, Stojanovic N, et al. A simple and cost-effective method to transfect small interfering RNAs into pancreatic cancer cell lines using polyethylenimine. *Pancreas.* 2011;40(1):144-150. doi:10.1097/MPA.0b013e3181f7e41c.

- 79 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- 80 Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):525-527. doi:10.1038/nbt.3519.
- 81 Yates AD, Achuthan P, Akanni W, et al. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D682-D688. doi:10.1093/nar/gkz966.
- 82 Pimentel H, Bray NL, Puente S, Melsted P, Pachter L. Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty. *Nat Methods*. 2017;14(7):687-690. doi:10.1038/nmeth.4324.
- 83 Wald A. Tests of statistical hypotheses concerning several parameters when the number of observations is large. *Trans Amer Math Soc*. 1943;54(3):426-482. doi:10.1090/S0002-9947-1943-0012401-3.
- 84 Chen EY, Tan CM, Kou Y, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:128. doi:10.1186/1471-2105-14-128.
- 85 Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W90-7. doi:10.1093/nar/gkw377.
- 86 Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):27-30. doi:10.1093/nar/28.1.27.
- 87 Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2019;28(11):1947-1951. doi:10.1002/pro.3715.

- 88 Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Ishiguro-Watanabe M, Tanabe M. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D545-D551. doi:10.1093/nar/gkaa970.
- 89 Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics.* 2000;25(1):25-29. doi:10.1038/75556.
- 90 The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D325-D334. doi:10.1093/nar/gkaa1113.
- 91 European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute. Automatic annotation of non-coding genes. Ensembl. Dezember 2021. Abgerufen am 8. März 2022. <https://www.ensembl.org/info/genome/genebuild/ncrna.html>
- 92 Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair and Regeneration.* 2014;22(3):313-325. doi:10.1111/wrr.12173.
- 93 El-Achkar TM, Dagher PC. Renal Toll-like receptors: recent advances and implications for disease. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2006;2(10):568-581. doi:10.1038/ncpneph0300.
- 94 Lombardo E, DelaRosa O, Mancheño-Corvo P, Menta R, Ramírez C, Büscher D. Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential. *Tissue engineering. Part A.* 2009;15(7):1579-1589. doi:10.1089/ten.tea.2008.0340.
- 95 Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999;18(49):6853-6866. doi:10.1038/sj.onc.1203239.

- 96 Devarajan P. Review: neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology*. 2010;15(4):419-428. doi:10.1111/j.1440-1797.2010.01317.x.
- 97 Verstrepen L, Bekaert T, Chau T-L, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(19):2964-2978. doi:10.1007/s00018-008-8064-8.
- 98 Li J, Chen Y, Deng F, Zhao S. Protective effect and mechanisms of exogenous neutrophil gelatinase-associated lipocalin on lipopolysaccharide-induced injury of renal tubular epithelial cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;515(1):104-111. doi:10.1016/j.bbrc.2019.05.102.
- 99 Kritselis I, Tzanetakou V, Adamis G, et al. The level of endotoxemia in sepsis varies in relation to the underlying infection: Impact on final outcome. *Immunol Lett*. 2013;152(2):167-172. doi:10.1016/j.imlet.2013.05.013.
- 100 Kimbrell MR, Warshakoon H, Cromer JR, et al. Comparison of the immunostimulatory and proinflammatory activities of candidate Gram-positive endotoxins, lipoteichoic acid, peptidoglycan, and lipopeptides, in murine and human cells. *Immunol Lett*. 2008;118(2):132-141. doi:10.1016/j.imlet.2008.03.009.
- 101 Baer PC, Koch B, Hickmann E, et al. Isolation, Characterization, Differentiation and Immunomodulatory Capacity of Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Human Perirenal Adipose Tissue. *Cells*. 2019;8(11). doi:10.3390/cells8111346.
- 102 Kenis G, Teunissen C, Jongh R de, Bosmans E, Steinbusch H, Maes M. STABILITY OF INTERLEUKIN 6, SOLUBLE INTERLEUKIN 6 RECEPTOR

- TOR, INTERLEUKIN 10 AND CC16 IN HUMAN SERUM. *Cytokine*. 2002;19(5):228-235. doi:10.1006/cyto.2002.1961.
- 103 Munshi N, Fernandis AZ, Cherla RP, Park I-W, Ganju RK. Lipopolysaccharide-induced apoptosis of endothelial cells and its inhibition by vascular endothelial growth factor. *J Immunol*. 2002;168(11):5860-5866. doi:10.4049/jimmunol.168.11.5860.
- 104 Wu J, Niu P, Zhao Y, et al. Impact of miR-223-3p and miR-2909 on inflammatory factors IL-6, IL-1 β , and TNF- α , and the TLR4/TLR2/NF- κ B/STAT3 signaling pathway induced by lipopolysaccharide in human adipose stem cells. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212063. doi:10.1371/journal.pone.0212063.
- 105 Roach JC, Glusman G, Rowen L, et al. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9577-9582. doi:10.1073/pnas.0502272102.
- 106 Silva KR, Baptista LS. Adipose-derived stromal/stem cells from different adipose depots in obesity development. *World J Stem Cells*. 2019;11(3):147-166. doi:10.4252/wjsc.v11.i3.147.
- 107 Villegas VE, Zaphiropoulos PG. Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(2):3251-3266. doi:10.3390/ijms16023251.
- 108 Liangpunsakul S, Toh E, Ross RA, et al. Quantity of alcohol drinking positively correlates with serum levels of endotoxin and markers of monocyte activation. *Sci Rep*. 2017;7(1):4462. doi:10.1038/s41598-017-04669-7.
- 109 Bull-Otterson L, Feng W, Kirpich I, et al. Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment. *PLoS One*. 2013;8(1):e53028. doi:10.1371/journal.pone.0053028.

- 110 Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *Journal of Hepatology*. 2000;32(5):742-747. doi:10.1016/S0168-8278(00)80242-1.
- 111 Kerr J, Anderson C, Lippman SM. Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. *The Lancet Oncology*. 2017;18(8):e457-e471. doi:10.1016/S1470-2045(17)30411-4.
- 112 Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29(1):415-445. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322.
- 113 Wu H, Ballantyne CM. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circ Res*. 2020;126(11):1549-1564. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315896.
- 114 Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-1772. doi:10.2337/db06-1491.
- 115 Moreira APB, Texeira TFS, Ferreira AB, Peluzio MdCG, Alfenas RdCG. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr*. 2012;108(5):801-809. doi:10.1017/S0007114512001213.
- 116 Laugerette F, Vors C, Géloën A, et al. Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2011;22(1):53-59. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.11.011.
- 117 Fang W, Xue H, Chen X, Chen K, Ling W. Supplementation with Sodium Butyrate Modulates the Composition of the Gut Microbiota and Ameliora-

- tes High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *J Nutr.* 2019;149(5):747-754. doi:10.1093/jn/nxy324.
- 118 Ji Y, Sakata Y, Tso P. Nutrient-induced inflammation in the intestine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011;14(4):315-321. doi:10.1097/MCO.0b013e3283476e74.
- 119 Slyepchenko A, Maes M, Machado-Vieira R, et al. Intestinal Dysbiosis, Gut Hyperpermeability and Bacterial Translocation: Missing Links Between Depression, Obesity and Type 2 Diabetes. *Current Pharmaceutical Design.* 2016;22(40):6087-6106. doi:10.2174/1381612822666160922165706.
- 120 Tilg H, Zmora N, Adolph TE, Elinav E. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(1):40-54. doi:10.1038/s41577-019-0198-4.
- 121 Chawla A, Nguyen KD, Goh YPS. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):738-749. doi:10.1038/nri3071.
- 122 Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(1):15-28. doi:10.1038/nrendo.2015.189.
- 123 Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(11):3015-3025. doi:10.1172/JCI28898.
- 124 Lancaster GI, Langley KG, Berglund NA, et al. Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. *Cell Metabolism.* 2018;27(5):1096-1110.e5. doi:10.1016/j.cmet.2018.03.014.

- 125 Serena C, Keiran N, Ceperuelo-Mallafre V, et al. Obesity and Type 2 Diabetes Alters the Immune Properties of Human Adipose Derived Stem Cells. *STEM CELLS*. 2016;34(10):2559-2573. doi:10.1002/stem.2429.
- 126 Yue S, Jiayuan Q, Liyue G, Ding Y, Chengfu Y. Long Non-coding RNAs in Metabolic and Inflammatory Pathways in Obesity. *Current Pharmaceutical Design*. 2020;26(27):3317-3325. <https://www.eurekaselect.com/180252/article>.
- 127 Baek SJ, Kang SK, Ra JC. In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors. *Exp Mol Med*. 2011;43(10):596-603. doi:10.3858/emm.2011.43.10.069.
- 128 Herzmann N, Salamon A, Fiedler T, Peters K. Analysis of migration rate and chemotaxis of human adipose-derived mesenchymal stem cells in response to LPS and LTA in vitro. *Experimental Cell Research*. 2016;342(2):95-103. doi:10.1016/j.yexcr.2016.03.016.
- 129 Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *STEM CELLS*. 2008;26(1):99-107. doi:10.1634/stemcells.2007-0563.
- 130 Schulte G, Bryja V. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*. 2007;28(10):518-525. doi:10.1016/j.tips.2007.09.001.
- 131 He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*. 2004;131(8):1663-1677. doi:10.1242/dev.01117.

- 132 Hatsell S, Rowlands T, Hiremath M, Cowin P. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2003;8(2):145-158. doi:10.1023/a:1025944723047.
- 133 Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2003;1653(1):1-24. doi:10.1016/S0304-419X(03)00005-2.
- 134 Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68-75. doi:10.4161/org.4.2.5851.
- 135 Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434(7035):843-850. doi:10.1038/nature03319.
- 136 Santos A, Bakker AD, Blicck-Hogervorst JMA de, Klein-Nulend J. WNT5A induces osteogenic differentiation of human adipose stem cells via rho-associated kinase ROCK. *Cytotherapy*. 2010;12(7):924-932. doi:10.3109/14653241003774011.
- 137 James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:684736. doi:10.1155/2013/684736.
- 138 Herzmann N, Salamon A, Fiedler T, Peters K. Lipopolysaccharide induces proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro via TLR4 activation. *Experimental Cell Research*. 2017;350(1):115-122. doi:10.1016/j.yexcr.2016.11.012.
- 139 Fiedler T, Salamon A, Adam S, Herzmann N, Taubenheim J, Peters K. Impact of bacteria and bacterial components on osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*. 2013;319(18):2883-2892. doi:10.1016/j.yexcr.2013.08.020.
- 140 Cho HH, Shin KK, Kim YJ, et al. NF-kappaB activation stimulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from human adipo-

- se tissue by increasing TAZ expression. *J Cell Physiol.* 2010;223(1):168-177. doi:10.1002/jcp.22024.
- 141 Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathway during Inflammation. *Front Immunol.* 2016;7:378. doi:10.3389/fimmu.2016.00378.
- 142 Amin V, Harris RA, Onuchic V, et al. Epigenomic footprints across 111 reference epigenomes reveal tissue-specific epigenetic regulation of lincRNAs. *Nat Commun.* 2015;6:6370. doi:10.1038/ncomms7370.
- 143 Cabili MN, Trapnell C, Goff L, et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* 2011;25(18):1915-1927. doi:10.1101/gad.17446611.
- 144 Huang G, Kang Y, Huang Z, et al. Identification and Characterization of Long Non-Coding RNAs in Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2017;42(3):1037-1050. doi:10.1159/000478751.
- 145 Necseulea A, Kaessmann H. Evolutionary dynamics of coding and non-coding transcriptomes. *Nat Rev Genet.* 2014;15(11):734-748. doi:10.1038/nrg3802.
- 146 Sun Q, Hao Q, Prasanth KV. Nuclear Long Noncoding RNAs: Key Regulators of Gene Expression. *Trends Genet.* 2018;34(2):142-157. doi:10.1016/j.tig.2017.11.005.
- 147 Zhang J, Chu M. Targeting of IL-6-Relevant Long Noncoding RNA Profiles in Inflammatory and Tumorous Disease. *Inflammation.* 2019;42(4):1139-1146. doi:10.1007/s10753-019-00995-2.
- 148 Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells.* 2014;6(3):256-265. doi:10.4252/wjsc.v6.i3.256.

- 149 Li K, Wu Y, Yang H, Hong P, Fang X, Hu Y. H19/miR-30a/C8orf4 axis modulates the adipogenic differentiation process in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):20925-20934. doi:10.1002/jcp.28697.
- 150 Pang H-l, Zhao Q-q, Ma Y, et al. Long Noncoding RNA H19 Participates in the Regulation of Adipose-Derived Stem Cells Cartilage Differentiation. *Stem cells international.* 2019;2019:2139814. doi:10.1155/2019/2139814.
- 151 Yu L, Qu H, Yu Y, Li W, Zhao Y, Qiu G. LncRNA-PCAT1 targeting miR-145-5p promotes TLR4-associated osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *J Cell Mol Med.* 2018;22(12):6134-6147. doi:10.1111/jcmm.13892.
- 152 Kornienko AE, Dotter CP, Guenzl PM, et al. Long non-coding RNAs display higher natural expression variation than protein-coding genes in healthy humans. *Genome Biol.* 2016;17:14. doi:10.1186/s13059-016-0873-8.
- 153 Scicluna BP, Uhel F, van Vught LA, et al. The leukocyte non-coding RNA landscape in critically ill patients with sepsis. *Elife.* 2020;9. doi:10.7554/eLife.58597.
- 154 Baer PC, Kuçi S, Krause M, et al. Comprehensive phenotypic characterization of human adipose-derived stromal/stem cells and their subsets by a high throughput technology. *Stem Cells Dev.* 2013;22(2):330-339. doi:10.1089/scd.2012.0346.
- 155 Patel RS, Carter G, El Bassit G, et al. Adipose-derived stem cells from lean and obese humans show depot specific differences in their stem cell markers, exosome contents and senescence: role of protein kinase C delta (PKC δ) in adipose stem cell niche. *Stem Cell Investig.* 2016;3:2. doi:10.3978/j.issn.2306-9759.2016.01.02.

- 156 Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *STEM CELLS*. 2006;24(2):376-385. doi:10.1634/stemcells.2005-0234.
- 157 Takele Assefa A, Vandesompele J, Thas O. On the utility of RNA sample pooling to optimize cost and statistical power in RNA sequencing experiments. *BMC Genomics*. 2020;21(1):312. doi:10.1186/s12864-020-6721-y.
- 158 Park E, Cho H-B, Takimoto K. Effective gene delivery into adipose-derived stem cells: transfection of cells in suspension with the use of a nuclear localization signal peptide-conjugated polyethylenimine. *Cytotherapy*. 2015;17(5):536-542. doi:10.1016/j.jcyt.2014.11.008.
- 159 Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol*. 2005;23(4):457-462. doi:10.1038/nbt1081.
- 160 Cubillos-Ruiz JR, Engle X, Scarlett UK, et al. Polyethylenimine-based siRNA nanocomplexes reprogram tumor-associated dendritic cells via TLR5 to elicit therapeutic antitumor immunity. *J Clin Invest*. 2009;119(8):2231-2244. doi:10.1172/JCI37716.
- 161 Robinson EK, Covarrubias S, Carpenter S. The how and why of lncRNA function: An innate immune perspective. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2020;1863(4):194419. doi:10.1016/j.bbagr.2019.194419.
- 162 Zeng Y, Cullen BR. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA*. 2002;8(7):855-860. doi:10.1017/s1355838202020071.
- 163 Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013;154(2):442-451. doi:10.1016/j.cell.2013.06.044.

- 164 Darnell RB. HITS-CLIP: panoramic views of protein-RNA regulation in living cells. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2010;1(2):266-286. doi:10.1002/wrna.31.
- 165 Zhu Y, Gui W, Lin X, Li H. Knock-down of circular RNA H19 induces human adipose-derived stem cells adipogenic differentiation via a mechanism involving the polypyrimidine tract-binding protein 1. *Experimental Cell Research*. 2020;387(2):111753. doi:10.1016/j.yexcr.2019.111753.