

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

***Micro-RNA-125a erhöht die endotheliale Permeabilität  
über direkte Interaktion mit VE-Cadherin und indirekte  
Interaktion mit dem TGF- $\beta$ -Rezeptor-2***

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

vorgelegt von

Leana Valena Ließke

aus

Solingen

Jahr

2023

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Simone Kreth

Mitberichterstatter: PD Dr. Michael Czihal  
Prof. Dr. Viktoria Bogner-Flatz

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Martin Müller

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>14</b>
1.1 Akute Inflammation.....	14
1.2 Endotheliale Dysfunktion.....	15
1.2.1 Endotheliale Barrierefunktion .....	15
1.3 TGF- $\beta$ Signalweg .....	18
1.4 Micro-RNA.....	18
1.4.1 Biogenese und Funktion von miRNA .....	19
1.4.2 MiRNA im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens.....	21
1.4.3 MiR-125a.....	21
1.5 Fragestellung.....	22
<b>2 Material</b> .....	<b>23</b>
2.1 Geräte .....	23
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	24
2.2.1 Chemikalien.....	24
2.2.2 Verbrauchsmaterialien.....	28
2.3 Zellen und Bakterien .....	29
2.4 Medien, Puffer und Gele .....	29
2.5 Oligonukleotide.....	32
2.6 Antikörper .....	33
2.6.1 Antikörper für Western Blots .....	33
2.6.2 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung .....	33
<b>3 Methoden</b> .....	<b>35</b>
3.1 Zellbiologische Methoden.....	35
3.1.1 Kultivierung von Zellen.....	35
3.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Zellviabilität .....	35
3.1.3 Isolation von HUVECs.....	36
3.1.4 Kryokonservierung von HUVECs .....	36
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	37
3.2.1 RNA-Isolation .....	37
3.2.2 cDNA-Synthese.....	37
3.2.3 Quantifizierung der mRNA-Expression .....	38

3.2.4	Quantifizierung der miR125a-Expression.....	39
3.3	Klonierung eines 3'UTR-Vektorkonstruktes.....	40
3.3.1	Klonierung in den StrataClone PCR Cloning Vektor .....	40
3.3.2	Klonierung in den psiCHECK™-2-Vektor.....	42
3.3.3	Gerichtete Mutagenese .....	43
3.3.4	Plasmidpräparation und DNA-Sequenzierung .....	44
3.4	Transiente Transfektion durch Elektroporation .....	44
3.4.1	Transiente Transfektion von HUVECs .....	44
3.4.2	Dualer Luciferase-Reportergen-Assay .....	45
3.4.3	Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie 46	
3.5	Proteinbiochemische Methoden .....	46
3.5.1	Gewinnung von Gesamtprotein und Proteinbestimmung.....	46
3.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
3.5.3	Western-Blot und Immunodetektion .....	47
3.6	Immunfluoreszenzfärbungen.....	47
3.7	Inflammatorische Stimulation von HUVECs .....	48
3.8	Permeabilitätsassay .....	48
3.9	Statistische Auswertung .....	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
4.1	Inflammatorische Stimulation führt zur Induktion der miR-125a in primären HUVECs .....	50
4.2	Transfektion mit pre-miR-125a führt zur Überexpression der miR-125a.....	51
4.3	Identifikation potenzieller Zielgene der miR-125a .....	52
4.4	VE-Cadherin unterliegt einer direkten Regulation durch miR-125a .....	53
4.4.1	Validierung VE-Cadherins als potenzielles Target der miR-125a ....	53
4.4.2	Nachweis einer direkten Regulation VE-Cadherins durch miR-125a 55	
4.5	Der TGFBR2 stellt ein indirektes Target der miR-125a dar .....	56
4.5.1	Validierung TGFBR2 als potenzielles Zielgen der miR-125a.....	56
4.5.2	Ausschluss einer direkten Regulation des TGFBR2 durch miR-125a 57	
4.6	Eine MiR-125a Überexpression führt zur erhöhten FITC-Albumin Passage über das endotheliale <i>Monolayer</i> .....	58
4.7	Spezifischer Knock-Down von VE-Cadherin in HUVECs führt zu einer gesteigerten FITC-Albumin Passage über das endotheliale <i>Monolayer</i> .	59
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
5.1	Ausblick .....	64
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>72</b>
	<b>Affidavit .....</b>	<b>73</b>

---

**Wissenschaftliche Veröffentlichung der Daten dieser Arbeit ..... 74**

## Zusammenfassung

Akut inflammatorische Krankheitsbilder - wie die Sepsis - stellen auch im 21. Jahrhundert eine der führenden Todesursachen auf Intensivstationen da. An ihrer Pathogenese ist unter anderem eine Störung der endothelialen Barrierefunktion mit einhergehender Hyperpermeabilität beteiligt. Durch den Übertritt von intravasaler Flüssigkeit in das Interstitium kommt es zur Ausbildung von generalisierten Ödemen. Der resultierende Mangel an intravasalem Volumen beeinträchtigt Hämodynamik und Mikrozirkulation, was im weiteren Verlauf zu einem Multiorganversagen führen kann [1-6]. Durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits eine Regulation der endothelialen Adhäsion von Monozyten im inflammatorischen Milieu durch miR-125a nachgewiesen werden [7]. Da miRNAs in funktionellen Netzwerken agieren [8], sollte nun die Rolle der miR-125a in der Regulation der endothelialen Barrierefunktion charakterisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine inflammatorische Stimulation von primären HUVECs mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  zu einer Induktion der miR-125a führt. Mittels in-silico Analyse eines *Next Generation Sequencing* konnten das Adhäsionsmolekül VE-Cadherin und der TGF- $\beta$ -Rezeptor 2 (TGFB2) als potenzielle Zielgene der miR-125a identifiziert und anschließend mittels Western Blot und qRT-PCR validiert werden. In Reporterexperimenten konnte eine direkte Regulation des VE-Cadherins durch miR-125a nachgewiesen werden, wohingegen der TGFB2 keiner direkten Regulation unterlag. Die endotheliale Überexpression der miR-125a führte zu gesteigerter Permeabilität mit erhöhter Passage von FITC markiertem Albumin über das endotheliale *Monolayer*. Passend dazu konnte ein vergleichbarer, hyperpermeabler Phänotyp durch *knock-down* von VE-Cadherin mittels siRNA hervorgerufen werden.

Zusammengefasst zeigte sich nach inflammatorischer Stimulation eine gesteigerte Expression der endothelialen miR-125a in HUVECs. Dies führt über direktes Targeting des 3'-UTR zu einer Repression des Adhäsionsmoleküls VE-Cadherin und konsekutiv zu einer gesteigerten Permeabilität der Endothelzellschicht. In akut-inflammatorischen Krankheitsbildern könnte dieser Mechanismus am pathologischen Verlust intravasaler Flüssigkeit und an der Bildung von Ödemen beteiligt sein. MiR-125a könnte daher ein mögliches therapeutisches Target in zukünftigen Strategien zur Wiederherstellung der endothelialen Integrität bei akut-inflammatorischen Krankheitsbildern sein.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung endothelialer Adhäsionsverbindungen (modifiziert nach Wettschureck et al, 2019 [9, 29-32]).....	17
Abbildung 2: Schematische Darstellung der miRNA Biogenese (nach Winter et al, 2009 [58]).....	20
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zum Permeabilitätsassay.....	48
Abbildung 4: Inflammatorische Stimulation von HUVECs führt zu einer Induktion der miR-125a-Expression.....	50
Abbildung 5: Transfektion mit pre-miR-125a führt zu einer Überexpression der miR-125a.....	51
Abbildung 6: Transfektionseffizienz in primären Humanen Endothelzellen (HUVECs).....	52
Abbildung 7: Validierung VE-Cadherins als Target der miR-125a.....	54
Abbildung 8: Nachweis einer direkten Regulation der VE-Cadherin-Expression durch miR-125a.....	55
Abbildung 9: TGFBR2 mRNA und Proteinexpression in HUVECs nach Transfektion mit pre-miR-125a.....	56
Abbildung 10: Ausschluss einer direkten Regulation der TGFBR2-Expression durch miR-125a.....	57
Abbildung 11: Überexpression der miR-125a führt zu einer gesteigerten FITC- Albumin Passage.....	58
Abbildung 12: Ein Knock-Down von VE-Cadherin durch RNA-Inteferenz führt zu einer Erhöhung der FITC-Albumin-Passage.....	59

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	23
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.....	24
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 4: Verwendete Zellen und Bakterien.....	29
Tabelle 5: Rezepturen für Medien, Puffer und Gele .....	29
Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide.....	32
Tabelle 7: Verwendete Antikörper für Western Blots.....	33
Tabelle 8: Antikörper für Immunfluoreszenz.....	33
Tabelle 9: Zellkulturbedingungen .....	35
Tabelle 10: Versuchsaufbauten mit HUVECs.....	44
Tabelle 11: Ergebnis der in-silico Vorhersage auf potenzielle Bindestellen der miR-125a in der VE-Cadherin 3'-UTR sowie in der TGFBR2-3'-UTR.....	53



## Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	3' untranslatierte Region
Aa. umbilicalis	Arteriae umbilicalis
ALKs	Activin receptor like kinases
AP-1	Activation protein 1
APACHE II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD31	Cluster of differentiation 31
CDH5	Cadherin 5
cDNA	Complementary DNA
CP	Crossing point
Cre	Cyclization recombination
CREB	cAMP response element binding
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DGCR8	DiGeorge syndrom critical region 8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
E. Coli	Escherichia coli

ECGM	Endothelial cell growth medium
ECIS	electric cell-substrate impedance sensing
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EndMT	Endothelial-to-mesenchymal Transition
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fetal calf serum
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HEK-293	Human Embryonic Kidney 293 Zellen
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IRF-3	Interferon regulatory factor 3
JAMs	Junctional Adhesion Molecules

kb	Kilo-Basenpaare
KO	Kontrolle
LB	Lysogeny broth
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein Kinase
miRNA, miR	Micro RNA
mRNA	Messenger RNA
Mut1	Mutierte Bindestelle 1
Mut2	Mutierte Bindestelle 2
MW	Mittelwert
n. Chr.	nach Christus
NaCl	Natrium-Chlorid
NC	Negativkontrolle
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLR	NOD-like-Rezeptoren
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
NSCLC	Non-small cell lung carcinoma
Nt	Nukleotide
Oligo-(dT)	Oligo-Desoxythymidin
oxLDL	Oxidiertes low-density Lipoprotein
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PASMCs	pulmonary artery smooth muscle cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Pol II / Pol III	Polymerase II / III
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

Pre-miRNA	Precursor miRNA
Pri-miRNA	Primary miRNA
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	Quantitative real-time Polymerase Kettenreaktion
R-SMAD	Rezeptor-regulierter SMAD
Ras	Rat sarcoma
Ran	Ras-related nuclear protein-Guanosintriphosphat
RIPA Buffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
Rho	Ras homologue
SDS-Page	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standardfehler
siRNA	Small interfering RNA
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SMAD	common-mediator-SMAD
SOC-Medium	Super Optimal Broth-Medium
SOFA	Sepsis-related organ failure assessment score
TBP	TATA-Box Binding Protein
TBST	Tris-buffered saline with Tween® 20
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGFBR1	Transforming Growth Factor beta Receptor 1

TGFBR2	Transforming Growth Factor beta Receptor 2
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
UPL	Universal ProbeLibrary
UV	Ultraviolett
V. umbilicalis	Vena umbilicalis
VE-Cadherin	Vascular endothelial Cadherin
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
VEGFR3	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3
VM	Vollmutante
WT	Wildtyp
ZO	Zonula occludens

# 1 Einleitung

## 1.1 Akute Inflammation

Die akute Inflammationsreaktion ist ein physiologischer Prozess mit dem Ziel der Wundheilung und Abwehr von Infektionen [7]. Bereits im 1. Jahrhundert n.Chr. beschrieb Cornelius Celsus mit "*Rubor et tumor cum calore et dolor*" – Rötung und Schwellung mit Überwärmung und Schmerz – die Kardinalsymptome einer Entzündung, welche 1858 durch Rudolf Virchow noch um die "*functio laesa*" erweitert wurden [8, 9]. Heute stellt sich die Reaktion auf einen Gewebeschaden als eine komplex regulierte Immunantwort dar, welche unter physiologischen Bedingungen selbstlimitierend ist [7].

Das angeborene Immunsystem erkennt sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) und DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) über immunzellgebundene TLR (*Toll-like Rezeptoren*) oder NLR (*NOD-like Rezeptoren*) [1]. Nach der Rezeptoraktivierung werden über intrazelluläre Signalkaskaden Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise NF- $\kappa$ B, AP-1 und IRF-3 aktiviert. Es kommt zur gesteigerten Transkription von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, welche weitere Immunzellen rekrutieren und sowohl die Aktivierung des Endothels als auch die Initiierung der humoralen Immunantwort fördern [1, 3, 10, 11]. Die Aktivierung des Endothels ermöglicht Leukozyten die transendotheliale Migration in das Gewebe zum Ort der Inflammationsreaktion [3, 11], um dort die eingedrungenen Erreger zu eliminieren. Bei überschießender Immunantwort kann es jedoch zur Schädigung gesunden Gewebes kommen [12]. Nach erfolgreicher Inaktivierung des Pathogens führen anti-inflammatorische Zytokine zur Einleitung der Gewebereparatur, die in der Resolution der Inflammation mündet [10].

Eine fehlgeleitete Immunantwort begünstigt die Pathogenese von akuten, aber auch von chronischen Erkrankungen, wie beispielshalber die Entstehung von Neoplasien [7, 10]. Ein Beispiel für eine akut dysregulierte Immunantwort auf eine Infektion ist das Krankheitsbild der Sepsis [1, 11], welche eine der führenden Todesursachen von Patienten auf Intensivstationen weltweit darstellt [1, 13]. Schätzungen gehen alleine in Europa von über 3 Millionen Fällen pro Jahr aus, wovon etwa 700.000 Patienten noch im Krankenhaus versterben [11]. Definiert ist die Sepsis als lebensbedrohliche Organdysfunktion in Folge einer fehlgeleiteten Immunantwort auf eine Infektion [14, 15], wobei Phasen der Immunsuppression und der Hyperinflammation parallel oder abwechselnd verlaufen können [16]. Die Folge ist eine Störung des Komplementsystems, der Koagulation und der Endothelfunktion [17], die das Krankheitsbild weiter verstärken können. Insbesondere im septischen Schock, einer

besonders schweren Unterform der Sepsis, führt die endotheliale Dysfunktion durch die damit einhergehende Kreislaufinstabilität zu einer erhöhten Mortalität [1, 14, 15]. Im klinischen Alltag ist die Diagnosestellung durch den plötzlichen Auftritt und die unspezifischen Symptome meist erschwert, was den notwendig schnellen Therapiebeginn verzögert und damit die Heilungschancen der Patienten verschlechtert [17].

## 1.2 Endotheliale Dysfunktion

Blutgefäße sind luminal mit einer Einzelzellschicht aus Endothelzellen bedeckt [3]. Während man lange Zeit davon ausging, dass Endothelzellen nur eine passive Barriere innerhalb der Blutgefäße darstellen, belegen neuere Studien eine aktive Funktion dieser Zellen in physiologischen und pathologischen Prozessen [3]. Dabei bilden Endothelzellen eine semipermeable Barriere aus, welche den Übertritt von Blutbestandteilen, wie Nährstoffen, Sauerstoff und auch Leukozyten, in das Gewebe reguliert [1, 12, 18]. Ein intaktes Endothel schützt das Gewebe vor dem Eindringen von externen Noxen und übt mit der Regulation der Leukozyteninfiltration eine immunologische Funktion aus [12, 19]. Darüber hinaus spielt es eine essenzielle Rolle bei der Regulation der Hämostase und des vaskulären Tonus [12]. Die endotheliale Dysfunktion geht hingegen mit einer Störung der Hämostase, des Gefäßtonus sowie einer Barrierefunktionsstörung einher [12] und stellt eine pathophysiologische Grundlage akut inflammatorischer Krankheitsbilder wie der Sepsis und des septischen Schocks dar [1].

### 1.2.1 Endotheliale Barrierefunktion

Die Integrität des Endotheliums basiert auf der Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts und interzellulärer Adhäsionsverbindungen [1]. Einzelne Zellen sind durch *Adherens Junctions*, *Tight Junctions* und *Gap Junctions* miteinander verbunden [1, 11, 12]. Die Ausprägung der entsprechenden Zellverbindungen variiert je nach Gefäßbett, zwischen unterschiedlichen Arten von Endothelzellen und ist organspezifisch [20].

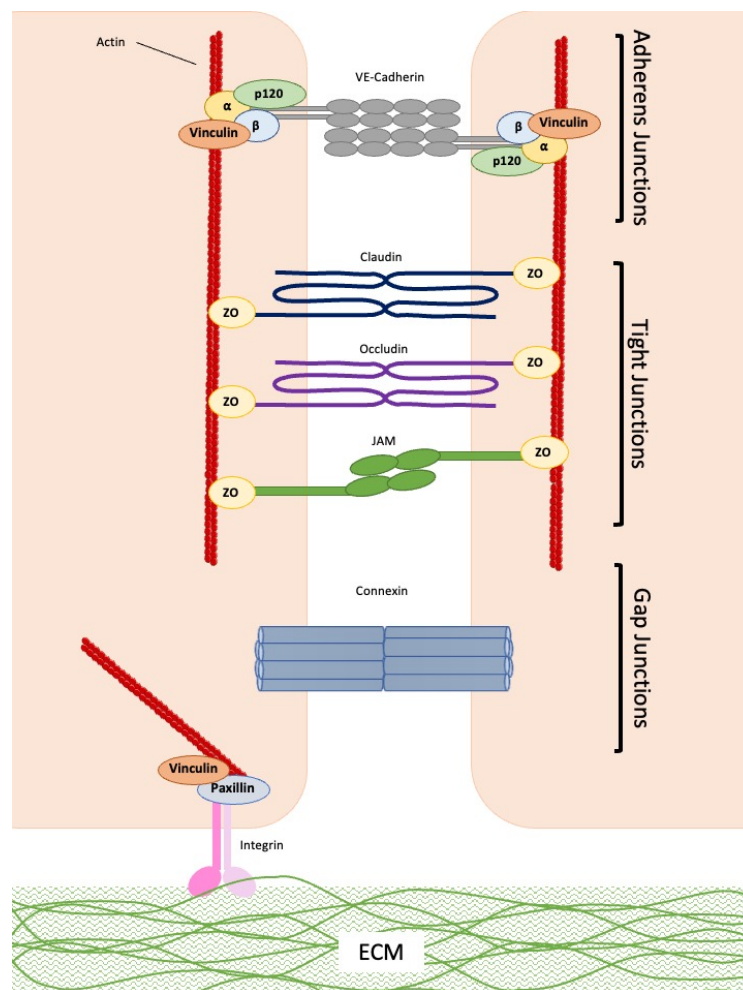
*Adherens Junctions* bestehen hauptsächlich aus einer homophilen Bindung von Cadherinen, welche auf zytoplasmatischer Seite direkt an p120-Catenin,  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin (Plakoglobin) binden. Der wichtigste Vertreter von Adhäsionsmolekülen in vaskulären Endothelzellen stellt das spezifische VE-Cadherin (*vascular endothelial-cadherin*) dar, das über sogenannte *actin-binding proteins*, wie  $\alpha$ -Catenin und Vinculin eine Bindung an das Aktin-Zytoskelett vermittelt. Auf diese Weise fördern *Adherens Junctions* die mechanische Stabilität der endothelialen Einzelzellschicht [2, 20-25].

*Tight Junctions* werden von Occludinen, Claudinen und *junctional adhesion molecules* (JAMs) ausgebildet, welche über Zonula occludens (ZO) Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind. Sie verschließen den parazellulären Bereich zwischen benachbarten Zellen und sind daher zum Beispiel entscheidend für die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke [3, 20, 23].

*Gap Junctions* hingegen stellen einen transmembranösen Kanal aus Connexinen dar und ermöglichen den interzellulären Austausch von Signalmolekülen und Ionen [3, 20].

Das Endothel liegt auf der abluminalen Seite einer Basalmembran auf, die aus Kollagen Typ IV und Laminin besteht [19]. Verankert wird die Basalmembran durch fokale Adhäsionsmoleküle, wie Integrine und *actin-linking proteins* (FAK, Talin, Paxillin), die an die Extrazelluläre Matrix (EZM) binden [23, 26]. An ihrer luminalen Oberfläche von Endothelzellen befindet sich die negativ geladene Glykokalyx, bestehend aus membranständigen Proteoglykanen, Glykoproteinen und Glykolipiden, an die sich über kovalente Bindungen Glycosaminoglykane anlagern [1, 11, 12, 26].





**Abbildung 1: Schematische Darstellung endothelialer Adhäsionsverbindungen (nach Wettschureck et al, 2019 [23, 27-30])**

Vereinfachte Darstellung des Aufbaus von *Adhärenz Verbindungen*, *Tight Junctions* und *Gap Junctions* sowie der Cell-Matrix Verbindung.  $\alpha$  =  $\alpha$ -Catenin,  $\beta$  =  $\beta$ -Catenin, p120 = p120-Catenin, ZO = Zonula occludens Protein.

Eine feine Regulation der endothelialen Barriere ist entscheidend für eine physiologische Funktion aller Organe [23]. Eine Störung äußert sich unter anderem in einem Verlust von intravasaler Flüssigkeit und Makromolekülen ins Interstitium mit Ausbildung von Ödemen [2, 3]. Als regulative Mechanismen sind unter anderem die Phosphorylierung und Internalisierung bzw. Degradierung, die Endozytose und der lysosomale Abbau von Adhäsionsproteinen anzuführen [2, 23, 31, 32]. An der Regulation über Phosphorylierung sind unterschiedliche Kinasen und Phosphatasen beteiligt [33, 34]. Beispielsweise führt die Entzündungsreaktion über die Aktivierung von pro-inflammatorischen Kinasen zur Phosphorylierung und anschließenden Internalisierung von VE-Cadherin, was zu erhöhten vaskulären Permeabilität über die Destabilisierung der *Adhärenz Verbindungen* beiträgt [1, 2, 32]. Zudem können Adhäsionsverbindungen Phosphatase und Kinase unabhängig reguliert werden. So führt beispielsweise eine Inaktivierung des

Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element binding*) durch IL-1 $\beta$  Signaling zu einer verminderten CREB-vermittelten Transkription VE-Cadherins [35].

### 1.3 TGF- $\beta$ Signalweg

Der *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) ist Teil einer hochkonservierten Zytokine-Familie und vermittelt eine gewebespezifische Kontrolle der Differenzierung, Proliferation und Motilität von Zellen [6, 36]. Zur TGF- $\beta$  Familie gehören 33 Gene, welche unter anderem für die *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs), das Anti-Müller-Hormon und die TGF- $\beta$ s kodieren [6].

Stimulation der TGF- $\beta$  Rezeptoren löst eine auf Phosphorylierung basierte intrazelluläre Signalkaskade aus, welche zur Aktivierung der SMAD-abhängigen Transkription führt [37]. Durch die Bindung des Liganden an einen Typ II Rezeptor erfolgt die Rekrutierung und Aktivierung des Typ I Rezeptors, welcher seinerseits die rezeptorassoziierten SMADs (R-SMADs) phosphoryliert. Der Komplex aus R-SMAD und SMAD4 (co-SMAD) agiert als nuklearer Transkriptionsfaktor [6, 38]. Alternative Signalkaskaden, beispielsweise über Ras und Rho GTPasen sowie MAP-Kinasen, sind ebenfalls beschrieben [6].

Menschliche Zellen können fünf Typ II und sieben Typ I Rezeptoren exprimieren, auch *activin receptor-like kinases* (ALKs) genannt, welche über eine Tyrosin Kinase Funktion verfügen, sodass jeder Ligand der TGF- $\beta$  Familie entsprechend gebunden werden kann [6, 36, 37]. So agiert TGF- $\beta$  in den meisten Zellen über Bindung an den TGF- $\beta$ -Rezeptor II (TGFB2) und ALK5, in Endothelzellen ist jedoch auch ein weitere Signalweg über ALK1 beschrieben [36, 39].

In Endothelzellen führt Stimulation mit TGF- $\beta$  unter anderem zur Erhöhung der endothelialen Permeabilität und spielt auch eine Rolle bei der Pathogenese akut inflammatorischer Erkrankungen, wie dem *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) [39-44].

### 1.4 Micro-RNA

Micro-RNAs (miRNA) sind kleine, nicht-kodierende RNA Moleküle mit durchschnittlich 22nt Länge. Über Interaktion mit dem 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) führen sie zum Abbau einer mRNA und damit zur posttranskriptionellen Genregulation [45].

1993 entdeckten Lee et al. bei Genomuntersuchung des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* in lin-4 ein Gen, welches nicht für ein Protein codierte, sondern als kleines RNA-Molekül die Proteinexpression von lin-14 reduzieren konnte [46]. Nach sieben Jahren

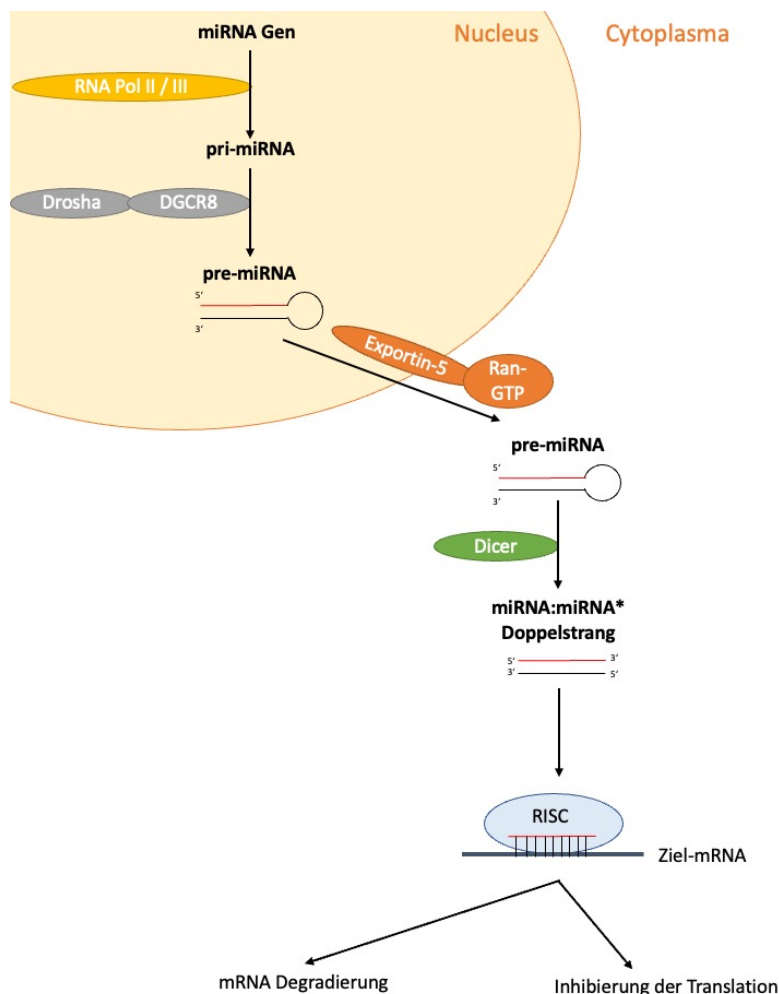
fand sich mit let-7 ein ähnliches Molekül, welches später auch im Menschen und anderen Spezies nachgewiesen werden konnte [47]. Die aktuelle Version der Datenbank miRBase beinhaltet 1917 beschriebene miRNAs im menschlichen Genom [48]. Man geht davon aus, dass miRNAs an der Feinregulierung von mehr als 60% [49] aller proteinkodierenden Gene beteiligt sind und so einen funktionellen Einfluss auf nahezu alle physiologischen und pathologischen zellulären Prozesse ausüben [5, 17, 45]. Da Veränderung der miRNA-Expression eine Veränderung der Genexpression zur Folge hat, kann bei entsprechender Fehlregulation die Entstehung von Krankheiten begünstigt werden [45].

### 1.4.1 Biogenese und Funktion von miRNA

Etwa die Hälfte der für miRNA kodierenden Gene des menschlichen Genoms verfügt bei intergenischer Lage über einen eigenen Promotor, während die andere Hälfte intragenisch lokalisiert ist und mit proteinkodierenden Genen ko-transkribiert wird [50]. Ihre Expression unterliegt äußeren Einflüssen, wie beispielsweise der Stimulation durch Inflammation, Hypoxie oder Medikamenteneinnahme [5].

Die Transkription des langen Primärtranskripts (pri-miRNA) erfolgt in der Regel durch eine RNA Polymerase II (Pol II) [51], wobei auch die Transkription durch eine RNA Pol III beschrieben ist [52]. Im Zellkern bildet die RNase III Drosha mit dem Cofaktor DGCR8 (*DiGeorge syndrome chromosome region 8*) einen sogenannten Mikroprozessor-Komplex aus, welcher aus der pri-miRNA eine etwa 65nt lange *precursor* miRNA (pre-miRNA) in Haarnadelstruktur herauschneidet [53, 54]. Der Transport der pre-miRNA ins Cytoplasma erfolgt aktiv durch das Exportprotein Exportin-5 und den Co-Faktor Ran-GTP [55]. Dort entsteht nach Prozessierung durch Dicer, ebenfalls eine RNase III, ein relativ labiler 21-25nt langer miRNA:miRNA\* Doppelstrang. Der stabilere miRNA Einzelstrang wird über ein Argonautenprotein in den *RNA induced silencing complex* (RISC) integriert. Der miRNA\* Strang wird degradiert [47, 53].

Jede miRNA verfügt über eine Bindestelle, welche die Nukleotide 2-7 ausgehend von ihrem 5' Ende umfasst. Bei Komplementarität der Bindestelle zum 3'-UTR der mRNA kommt es zum Abbau bzw. zu einer verminderten Translation der mRNA [56, 57].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der miRNA Biogenese (nach Winter et al, 2009 [58])**

Im Zellkern erfolgt die RNA-Polymerase II/III abhängige Transkription und Prozessierung der pri-miRNA durch die RNase III Drosha zur pre-miRNA. Nach Translokation ins Zytoplasma über Exportin-5 und Prozessierung durch die RNase III Dicer entsteht ein miRNA:miRNA\* Doppelstrang. Die reife miRNA wird in den RISC aufgenommen und interagiert mit der 3'-UTR der Ziel-mRNA, sodass es entweder zur mRNA-Degradierung oder verminderten Translation kommt.

Eine miRNA kann mehrere mRNAs regulieren und eine mRNA wird durch verschiedene miRNAs beeinflusst [45], sodass sich in der Summe der Interaktionen ein funktionelles Netzwerk ergibt. Der Effekt einer einzelnen miRNA auf die Gen-Expression eines Zielmoleküls ist damit gering, die kontextspezifische zelluläre Wirkung wird jedoch durch das funktionelle Netzwerk potenziert. Neben einer direkten Regulation kann eine miRNA die Genregulation auch indirekt beeinflussen, zum Beispiel über die Regulation von Transkriptionsfaktoren [5].

### 1.4.2 MiRNA im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens

Als schnell agierende Regulatoren der Gen-Expression spielen miRNAs auch eine Rolle während einer akuten Inflammation und können diese sowohl fördern als auch hemmen [45].

So werden beispielsweise durch post-transkriptionale Hemmung von Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B und HIF-1 $\alpha$ , die Expression von Oberflächenrezeptoren und Zytokine sowie weitere immunologische Prozesse, wie die Entwicklung und Aktivierung von Immunzellen gesteuert [5, 52].

Die Konzentration von extrazellulär zirkulierender miRNA kann bei Erkrankungen spezifisch verändert sein, was im Blut oder Urin nachweisbar ist [17]. So zeigt die Analyse von zirkulierenden miRNAs bei Sepsispatienten dynamische Veränderungen, welche mit der Krankheitsschwere und dem Outcome korrelieren [5, 17, 45, 59]. Beispielsweise wurde gezeigt, dass eine alterierte Expression der miR-25 oder miR-150 mit einer erhöhten Mortalität korreliert [59]. Auch die miR-225 zeigte sich im Blut von Patienten mit Sepsis im Vergleich zu SIRS-Patienten oder gesunden Kontrollpersonen vermindert exprimiert [59]. Des Weiteren konnte in Tierexperimenten gezeigt werden, dass eine miR-223 Deletion zu erhöhter Anfälligkeit für inflammatorische Prozesse führt und dass eine miR-146a Deletion die Ausbildung eines hyperresponsiven und inflammatorischen Phänotyps mit erhöhter Autoimmunität fördert. Die Hemmung der miR-27a führt hingegen zu einem Überlebensvorteil bei septischen Mäusen [45].

### 1.4.3 MiR-125a

Mit *lin-4*, die erste bei Genomanalysen im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckte miRNA, wurde eine evolutionär hochkonservierte miRNA beschrieben. Entsprechende Homologe finden sich in unterschiedlichen Spezies unter anderer Nomenklatur, so zum Beispiel als miR-125a im Genom von Wirbeltieren und dem Menschen [46, 60].

Die miR-125a ist Teil der miR-125 Familie, bestehend aus 3 Homologen (*hsa-miR-125a*, *hsa-miR-125b-1* und *hsa-miR-125b-2*) und ist lokalisiert auf dem 19. Chromosom (19q13) [60, 61]. Die Transkription erfolgt in einem Cluster mit miR-99b und *let-7e* über einen eigenständigen Promotor [60]. Sie spielt eine Rolle bei der Zell-Differenzierung, Proliferation und Apoptose, sodass sich eine differenzielle Expression in unterschiedlichsten Tumoren und Autoimmunerkrankungen findet [60-68]. Interessanterweise zeigten neuere Studien auch eine signifikant höhere Expression der miR-125a im Blut von Patienten mit Sepsis, wobei die plasmatische Expression mit der Krankheitsschwere korrelierte [62, 69].

## 1.5 Fragestellung

Akut inflammatorische Erkrankungen, wie die Sepsis und der septische Schock, stellen auch im 21. Jahrhundert schwerwiegende Erkrankungen dar, die nicht nur mit immensen Kosten für das Gesundheitssystem, sondern auch mit einer hohen Mortalität der betroffenen Patienten einher gehen. Eine wichtige pathophysiologische Grundlage der Sepsis liegt in der akuten endothelialen Dysfunktion [1, 11]. Durch die Erhöhung der vaskulären Permeabilität kommt es zum Verlust von intravasaler Flüssigkeit in das Interstitium, was zur Ausbildung von massiven Ödemen und in der Folge zum Multiorganversagen führt [2, 3]. Die miR-125a könnte hierbei eine Rolle spielen.

In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese untersucht werden, ob die miR-125a nach inflammatorischer Induktion einen Einfluss auf die endotheliale Barrierefunktion ausübt.

Folgende Fragestellungen sollen dabei beantwortet werden:

- 1) Ist die miR-125a-Expression in Endothelzellen als Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus induzierbar?
- 2) Führt die miR-125a zu einer endothelialen Dysfunktion mit erhöhter Permeabilität?
- 3) Über welche molekularen Mechanismen beeinflusst die miR-125a die Endothelfunktion?

Dies soll mithilfe eines Modells mit primären humanen Endothelzellen (HUVECs) untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

**Tabelle 1: Verwendete Geräte**

Attune™ Acoustic Focusing Cytometer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Apollo 200 Stickstoff-Tank	Cryotherm, Kirchen (Sieg)
BDK Laminar Flow Safety Sterilbank	Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Pfullinger
Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
BVC 21 Vakuumsaugpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Digital Imager	Hamamatsu Photonics, Hamatsu, Japan
E-BOX VX2 Gel Documentation System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Feinwaage MP 300	Chyo Balance Corp., Kyoto, Japan
FilterMax F3	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Heraeus Megafuge 40R Zentrifuge	Thermo Scientific, Schwerte
Heraeus Rotina 35R	Thermo Scientific, Schwerte
Hettich Mikro 200 Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Light Cycler® 480 II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer	IKA-Werke, Staufen
Mastercycler® Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Milli-Q Advantage A10 Water System	Merck KGaA, Darmstadt
Mini-PROTEAN® System Casting Stand	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific, Schwerte
NanoDrop™ NC-2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neon™ Transfection System	Invitrogen GmbH, Darmstadt

Olympus IX50 Inverted Phase Contrast Microscope	OLYMPUS EUROPA SE & CO. KG, Hamburg
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
SevenEasy pH	Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Schweiz
Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
Stickstoff	Linde AG, Pullach
Sub-Cell GT Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Thermo-Schüttler	CUSABIO, Wuhan, China
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Ultrasonic Homogenizer	Reitz Medical GmbH, Rosenheim
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	Promega GmbH, Mannheim
vapo.protect Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg
Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA
VWR Digital Vortex Mixer	VWR International, Leuven, Belgien
Wasserbad B3	Haake Technik GmbH, Vreden
Wasserbad SWB 25	Haake Technik GmbH, Vreden
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg

## 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

### 2.2.1 Chemikalien

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien**

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
-------------------	-------------------------------



Acrylamide/Bisacrylamid (30%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose SERVA Tabletten 0,5 g/Tablette	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Aqua	Berlin-Chemie AG, Berlin
Bovines Serum Albumin (BSA) 100×	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Clarity and Clarity Max Western ECL Substrates	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
CutSmart® Buffer	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Cy3 dye-labeled Pre-miR Negative Control	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNA Ladder 1 kb	Thermo Scientific, Schwerte
DNA Ladder 100 bp	Promega GmbH, Mannheim
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Grand Island, NY, USA
ECGM Supplement Mix	PromoCell, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	PromoCell, Heidelberg
Ethanol 100%	VWR Chemicals, Leuven, Belgium
Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
FastStart Essential DNA Probes Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fetales Bovines Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Fluoresceinisothiocyanat-Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Gel Loading Dye Purple (6×)	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Glycin	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Glycerol	Sigma Aldrich GmbH, München
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Apotheke Klinikum der Universität München, Munich
Hefe-Extrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt
hsa-miR125 pre-miR miRNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Human IFN- $\gamma$	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Human TNF- $\alpha$	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin
Magermilchpulver	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
MEM Non-essential Amino Acids (NEAA) (100×)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
miRNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Monarch DNA Gel Extraction Kit	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Natrium-Chlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Neon™ Transfection System 10 $\mu$ l Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Neon™ Transfection System 100 $\mu$ l Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
NotI-HF®	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Oligo-Desoxythymidin (Oligo-(dT)) Primer	Qiagen GmbH, Hilden
ON-TARGETplus Control Pool Non-Targeting Pool (siNC)	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
ON-TARGETplus siRNA-SMARTpool Human CDH5	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco, Grand Island, NY, USA

peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Qiagen GmbH, Hilden
peqGREEN DNA and RNA Dye	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phosphatase Inhibitor Cocktail (100×)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Apotheke Klinikum der Universität München
Pierce Bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Schwerte
Pierce™ RIPA Buffer	Thermo Scientific, Schwerte
Pre-miR™ Negative Control #1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Protease Inhibitor Cocktail (100×)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
psiCHECK™-2 Vector	Promega GmbH, Mannheim
Pure Yield Plasmid Midiprep System	Promega GmbH, Mannheim
QIAzol® Lysis Reagent	Qiagen GmbH, Hilden
QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Random Hexamers	Qiagen GmbH, Hilden
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase-free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease inhibitor	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Rotiphorese® 10× TAE-Buffer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte
StrataClone Ultra Blunt Polymerase Chain Reaction (PCR) Cloning Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
SuperScript III Reverse Transcriptase Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt

SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Waltham, MA, USA
T4 DNA Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4 DNA Ligase Buffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
TaqMan® MicroRNA Assay: U47, hsa-miR-125a-5p	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TEMED	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
TRIS	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
TRIS-HCl	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Lösung	Biochrom AG, Berlin
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt
Turbo DNA-Free Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
XhoI	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA

## 2.2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Glas- und Plastikwaren	A.Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg Beckman Coulter, Krefeld Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf Braun Melsungen AG, Melsungen
------------------------	---

DURAN Group GmbH, Wertheim
Eppendorf, Hamburg
Greiner Bio-One, Frickhausen
Heathrow Scientific LLC, Vernon Hills, USA
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Sarstedt, Nümbrecht
Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Thermo Scientific, Schwerte

## 2.3 Zellen und Bakterien

**Tabelle 4: Verwendete Zellen und Bakterien**

HEK 293 Cells	American Type Cell Culture Collection, Manassas Virginia, USA
Human umbilical vene endothelial cells	Primäre Isolation aus Nabelschnüren
NEB® 10-β Competent E. Coli	New England BioLabs Inc., Ipswich, UK
QuickChange® XL10-Gold Ultracompetent Cells	Agilent Technologies, Waldbronn
StrataClone SoloPack Competent Cells	Agilent Technologies, Waldbronn

## 2.4 Medien, Puffer und Gele

**Tabelle 5: Rezepturen für Medien, Puffer und Gele**

1% Agarose-Gel	100ml TAE-Puffer 1g Agarose 5µl peqGreen DNA and RNA Dye
----------------	--

Endothelial Cell Growth Medium	500ml ECGM-Medium + Supplement Mix, PromoCell, Heidelberg, Germany 10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin
3HEK- und U87-Medium	500mL DMEM-Medium (Dulbecco's modified Eagle Medium, Gibco) 10% FCS 1% L-Glutamin 1% Penicillin-Streptomycin 1% NEAA
Lämmli-Probenpuffer (5x)	0,5M Tris-HCl pH 6,8 45% Glycerol 10% SDS 12,5% 2-Mercaptoethanol 0,25% Bromphenolblau
LB-Agar	5g Trypton 5g Natriumchlorid 2,5g Hefeextrakt 7,5g Agar 500mL Aqua bidest.
LB-Medium	5g Trypton 5g Natriumchlorid 2,5g Hefeextrakt 500mL Aqua bidest.
PBS-T	PBS + 0,1% Tween-20

Sammelgel (4%)	3,774ml Aqua Bidest. 650µl Sammelgelpuffer 52µl 10% SDS 693µl 30% Acrylamid 20µl 40% APS 4µl TEMED
Sammelgelpuffer	1 M Tris, mit HCl eingestellt auf pH 6,8
SDS-Laufpuffer (10x)	250mM Tris 1,92 M Glycin 1% SDS
Stripping Buffer	1,5g Glycin 0,1g SDS 1ml Tween-20 gelöst in 100ml Aqua bidest pH 2,2, eingestellt mit HCl
Trenngel (8%)	8,516 ml Aqua Bidest. 3,5µl Trenngelpuffer 182µl 10% SDS 4,853ml 30% Acrylamid 70µl 40% APS 5,8µl TEMED
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, mit HCl eingestellt auf pH 8,8

## 2.5 Oligonukleotide

Alle PCR Primer wurden mit der Probe Finder Software von Roche Diagnostics generiert und von Metabion Martinsried synthetisiert. Die UPL-Sonden sind von Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland.

<b>Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide</b>		
<b>qPCR-Primer</b>	<b>Sequenz</b>	
GAPDH	Forward	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
	Reverse	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
TBP	Forward	5'-GAACATCATGGATCAGAACAACA-3'
	Reverse	5'-ATAGGGATTCCGGGAGTCAT-3'
TGFB2	Forward	5'-GGGAAATGACATCTCGCTGTA-3'
	Reverse	5'-CACCTTGAACCAAATGGAG-3'
VE-Cadherin	Forward	5'-AAGCCTCTGATTGGCACAGT-3'
	Reverse	5'-CTGGCCCTTGTCCTGGT-3'
<b>Klonierungs-Primer</b>	<b>Sequenz</b>	
TGFB2	Forward	5'-CTCGAGGAGACACTTACAAAGCTGCC-3'
	Reverse	5'-GCGGCCGCTCTCCT-ACAGTCCCTCTCT-3'
VE-Cadherin	Forward	5'-CTCGAGAGGATTCTCTGCAGCCCATT-3'
	Reverse	5'-GCGGCCGCCAGACG-AAGGGTGAGCTTG-3'
<b>Mutagenese-Primer</b>	<b>Sequenz</b>	
Bindestelle 1	Forward	5'-ACTGAACCACATTCACAGAAATGGCTTATTA-3'
	Reverse	5'-TAATAAGCCATTTCTGTGAATGTGGTTCAGT-3'
Bindestelle 2	Forward	5'-TGTTGTCACATCTCACAGAACTGACCCTCAG-3'
	Reverse	5'-CTGAGGGTCAGTTCTGTGAGATGTGACAACA-3'



## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 Antikörper für Western Blots

<b>Tabelle 7: Verwendete Antikörper für Western Blots</b>			
<b>Primärantikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung in 5% Magermilch in TBST</b>	<b>Hersteller</b>
Anti- $\beta$ -Actin	Rabbit	1:1000	#4970 Cell Signaling Technologies
Anti-TGFBR2 (E-6)	Mouse	1:1000	sc-17792, Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-VE-Cadherin (F-8)	Mouse	1:1000	sc-9989, Santa Cruz Biotechnologies, USA
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung in 5% Magermilch in TBST</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Mouse-IgG-HRP	Horse	1:3000	#7076 Cell Signaling Technologies
Anti-Rabbit-IgG-HRP	Goat	1:3000	#7074 Cell Signaling Technologies

### 2.6.2 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung

<b>Tabelle 8: Antikörper für Immunfluoreszenz</b>		
<b>Primärantikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-VE-Cadherin (F-8)	Mouse	sc-9989, Santa Cruz Biotechnologies, USA

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
anti-Mouse IgG (H+L) Sekundärantikörper, Alexa Fluor 488	Goat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zelllinien wurden in entsprechendem Zellkulturmedium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Umluft-Sterilbank durchgeführt. Die Passagierung erfolgte abhängig von der Proliferation nach dem Ablösen der Zellen mit 1ml Trypsin in EDTA (0,05%).

Zellen	Zellkulturmedium	Zellkulturplastik	Herkunft	Passagierung
human umbilical vene endothelial cells (HUVECs, adhärenent)	ECGM + 10% FCS + 1% Antibiose (Penicillin/Streptomycin)	Zellkulturschale	Isolation aus Nabelschnüren, pro Versuchsreihe nur einmal verwendet und als biologische Probe gewertet	Für Versuche nur HUVECs in 2. – 4. Passage verwendet
humane embryonale Nierenzellen (HEK-293, adhärenent)	HEK- und U87-Medium	Zellkulturflasche	American Type Cell Culture Collection	Bis 20. Passage

#### 3.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität wurde der Vi-Cell TM XR Cell Viability Analyzer als elektronisches Zellzählssystem mit Bildanalyse verwendet. Mittels Standard-Tryphan-Blau Färbung kann zwischen vitalen und toten Zellen differenziert werden, da Zellen ohne intakte Zellmembran mit Tryphan-Blau anfärbbar sind. Die Zellviabilität ist der Quotient von ungefärbten Zellen und Gesamtzellzahl. Nur Zellen mit einer Viabilität >90% wurden verwendet und für sämtliche Versuche nur der Anteil vitaler Zellen einkalkuliert.

### 3.1.3 Isolation von HUVECs

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) wurden aus frischen Nabelschnüren nach elektiver Sectio cesarea in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, am Klinikum der LMU München, isoliert. Zuvor wurden alle Spenderinnen entsprechend der Deklaration von Helsinki über das Vorhaben aufgeklärt und das schriftliche Einverständnis eingeholt. Die Abnahme und der Transport erfolgten komplett anonymisiert. Anschließend wurden die Nabelschnüre in 50ml sterilem PBS mit 1% Antibiose (Penicillin/Streptomycin) zur weiteren Isolation in das Labor gebracht.

Zu Beginn wurden die Nabelschnurenden sauber abgetrennt, sodass die V. Umbilicalis von den paarig angelegten Aa. Umbilicalis differenziert werden konnte. In die Enden der Vene wurde jeweils eine Knopfkanüle eingeführt, fixiert und mit einem Dreiwegehahn verschlossen. Dieses System ermöglicht ein Spülen der Vene mit erwärmtem PBS, sodass Blutrückstände und -gerinnsel entfernt sowie die Kontinuität der Vene sichergestellt werden konnte.

Mittels 1ml Kollagenase A (Roche) und 10ml HBSS wurden die Endothelzellen nach 10min Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aus dem Gewebe gelöst. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Nabelschnur über den oberen Dreiwegehahn mit erwärmtem M199 Medium durchspült und die Zellsuspension über den unteren Dreiwegehahn in einem 50ml Falcon aufgefangen. Nach Zentrifugation (250 x g, 5min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in ECGM + 10% FCS + 1% Antibiose (Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Die Zellen wurden ausplattiert und für mindestens 24h im Brutschrank kultiviert.

### 3.1.4 Kryokonservierung von HUVECs

Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 1ml kaltem Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO) auf Cryovials verteilt und in einem Mr. Frosty Freezing Container für mindestens 24h bei -80°C verwahrt. Die langfristige Konservierung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Wiederverwendung wurden die HUVECs in warmem ECGM + 10% FCS + 1% Antibiose resuspendiert und mit ausreichend Medium in Zellkulturschalen ausgesät. Nach Anheften der Zellen wurde das Medium gewechselt, um die vitalen Zellen nicht zu lange dem zellschädigenden DMSO auszusetzen.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 RNA-Isolation

RNA wurde mittels miRNeasy Mini Kit (Qiagen) durch Phenol-Chloroform Extraktion isoliert. Die Zellyse erfolgte mit QIAzol Lysis Reagenz. Unter Zugabe von Chloroform kam es nach Vortexen und Zentrifugation zur Phasenbildung. Die obere wässrige Phase enthält RNA, während die untere Phase und Interphase DNA und sonstige Zellbestandteile enthalten. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5ml Gefäß überführt und mit der 1,5-fachen Menge Ethanol versetzt. Zur Vorbeugung einer DNA-Kontaminierung wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Durch mehrere Waschschriffe über eine Silicamembran wurde die RNA aufgereinigt und zuletzt in RNase-freiem-Wasser eluiert. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgt am NanoDrop 2000 Spectrophotometer bei 260nm und 280nm. Bei reiner RNA liegt der Quotient der Messungen (260/280) bei 2,0.

### 3.2.2 cDNA-Synthese

Isolierte RNA wurde über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben, wobei alle Proben in gleicher Konzentration eingesetzt wurden. Im ersten Reaktionsansatz wurden 3µl im gleichen Maße bestehend aus Oligo-(dT) Primer, Random Hexamers und dNTPs mit 10µl der Probe über 5min bei 65°C im Thermocycler inkubiert und anschließend 1min auf Eis gestellt.

Diesem Ansatz wurden 7µl eines Gemisches aus 4µl 5x First-Strand-Buffer, 1µl 0,1M DTT sowie jeweils 1µl der Enzymen RNase Out und Super Script Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die Umschrift erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

- 1) 5min bei 25°C
- 2) 45min bei 50°C
- 3) 15min bei 70°C

Es ergab sich folgender endgültiger Reaktionsansatz:

RNA	10µl
Oligo-(dT) Primer	1µl
Random Hexamers	1µl
dNTPs	1µl
5x First-Strand-Buffer	4µl

0,1M DTT	1µl
RNase Out	1µl
Super Script Reverse Transkriptase	1µl
Gesamtvolumen	20µl

### 3.2.3 Quantifizierung der mRNA-Expression

Zur Quantifizierung der mRNA wurde diese mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) am LightCycler Roche 480 amplifiziert. Im Doppelansatz wurden 5µl cDNA (entsprechend 10ng) mit einem 15µl Primer Ansatz bestehend aus forward und reverse Primern, UPL-Sonden und ProbesMaster im Well einer LightCycler 480 Multiwell Platte vermengt.

Es ergab sich folgender Reaktionsansatz:

cDNA (c=2ng/µl)	5µl
Nukleasefreies Wasser	4,4µl
Primer forward	0,2µl
Primer reverse	0,2µl
UPL-Sonde	0,2µl
ProbesMaster	10µl
Gesamtvolumen	20µl

Der 2x LightCycler 480 ProbesMaster enthält die notwendigen dNTPs und die FastStart Taq DNA-Polymerase. UPL-Sonden sind Hydrolyse Sonden, welche die zu amplifizierenden DNA binden. An ihrem 5' Ende befindet sich ein Fluoreszein, dessen Signal allerdings durch einen Quencher an ihrem 3' Ende unterdrückt wird. Nur während der Synthese des Komplementärstranges werden Reporter und Quencher voneinander getrennt, sodass das Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Nach einer gewissen Anzahl an Zyklen übersteigt das Fluoreszenzsignal am sogenannten „crossing point“ (CP-Wert) die Hintergrundfluoreszenz. Über eine Kalibrierungskurve kann die enthaltene Menge der cDNA bestimmt werden. Je früher der CP-Punkt erreicht ist, desto mehr cDNA ist enthalten. Hierbei handelt es sich um eine absolute Quantifizierung. Eine relative Quantifizierung erhält man durch Bezug auf ein mitbestimmtes Referenzgen, ein sogenannten „Housekeeper-Gen“, welches konsekutiv exprimiert wird.

Die qRT-PCR beginnt mit einer Denaturierung (10min, 95°C), gefolgt von 45 Zyklen zur Amplifikation bestehend aus:

- 1) Denaturierung: 15s bei 95°C
- 2) Annealing: 30s bei 50°C
- 3) Elongation: 15s bei 72°C, 30s bei 40°C

### 3.2.4 Quantifizierung der miR125a-Expression

Zur Quantifizierung der miR-125a-Expression wurde die bereits isolierte RNA mittels TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben.

Folgender Reaktionsansatz wurde hierbei verwendet:

dNTP	0,09µl
MultiScribe RT (50/µl)	0,6µl
10 x RT Buffer	0,9µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,114µl
Nukleasefreies Wasser	0,696µl
RT Primer U47	1,8µl
RT Primer miR125a-5p	1,8µl
RNA (c=2ng/µl)	3µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>9µl</b>

Die Umschrift erfolgte im Thermocycler nach Inkubation auf Eis für 5min unter folgenden Reaktionsbedingungen:

- 1) 30min bei 16°C
- 2) 30min bei 42°C
- 3) 5min bei 85°C

Im Anschluss an die reverse Transkription folgte die qRT-PCR im Lightcycler der Firma Roche. Die miR125a-Expression wurde in Relation zur Referenz-miRNA U47 quantifiziert, welche als geeignete miRNA-Kontrolle unter inflammatorischen Bedingungen gilt [16]. Der gesamte cDNA-Ansatz wurde mit 24,8µl nukleasefreiem

Wasser verdünnt. Im Duplikat wurden 5µl dieses Ansatzes mit 15µl MasterMix, bestehend aus 4µl nukleasefreiem Wasser, 1µl Assay TM und 10µl 2x LightCycler 480 ProbesMaster, vermengt. Nach einer initialen Denaturierung (10min bei 95°C) folgten 50 Zyklen zur Amplifikation unter folgenden Reaktionsbedingung:

- 1) 15s bei 95°C
- 2) 60s bei 60°C
- 3) 30s bei 40°C

### 3.3 Klonierung eines 3'UTR-Vektorkonstruktes

#### 3.3.1 Klonierung in den StrataClone PCR Cloning Vektor

##### 3.3.1.1 Amplifikation

Zur Amplifikation eines Genes aus genomischer DNA wurde das StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit (Stratagene) verwendet. Als Primer wurden spezifische forward und reverse Primer mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XhoI und NotI eingesetzt.

Folgender Reaktionsansatz wurde zur PCR verwendet:

10x PfuUltra II Reaction Buffer	2,5µl
dNTP mix	0,5µl
Template DNA	100ng
Primer forward (10µM)	0,5µl
Primer reverse (10µM)	0,5µl
PfuUltra II fusion HS DNA Polymerase	0,5µl
nukleasefreies Wasser	ad 25µl

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler unter folgenden Reaktionsbedingungen:

- 1) initiale Denaturierung: 95°C für 2min
- 2) 30 Zyklen: 95°C für 20s, 62°C für 20s, 72°C für 15s
- 3) finale Elongation: 72°C für 3min

Zur Analyse der PCR wurde eine Gelelektrophorese (60min, 110V) in 1% Agarosegel durchgeführt und die Banden unter UV-Licht detektiert. Mittels zweier DNA-Molekulargewichtsmarker (100bp und 1kp) konnte die Fragmentgröße überprüft werden.



### 3.3.1.2 Ligation

Das PCR Produkt wurde in den Topoisomerase-Klonierungsvektor pSC-B-amp/kan legiert. Zur Ligation wurden 2µl des 1:10 verdünnten PCR-Produktes mit 3µl StrataClone Blunt Cloning Buffer und mit 1µl StrataClone Blunt Vector Mix amp/kan vermischt und für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Vektor Mix enthält zwei lineare Vektorstränge. Beide verfügen an einem Ende über eine Topoisomerase und am jeweils anderen Ende über eine loxP-Erkennungssequenz. Während der Inkubation legiert die Topoisomerase das PCR-Produkt als Verbindungsstück zwischen die beiden Vektorstränge, sodass ein linearer Doppelstrang mit loxP-Erkennungssequenzen an beiden Enden entsteht.

### 3.3.1.3 Hitzeschocktransformation

Zur Hitzeschocktransformation wurden kompetente E. Coli Bakterien (StrataClone SoloPack Competent Cells) verwendet. Diese enthalten eine sogenannten Cre-Rekombinase, welche die beiden loxP-Erkennungssequenzen miteinander zu einer Ringform verbindet. Der vollständige Ligationsansatz wurde durch Schwenken mit 50µl der E. Coli Bakterien vermischt und für 20min auf Eis inkubiert. Um die E. Coli für die Aufnahme des Vektors zu permeabilisieren, wurde der Transformationsansatz für 45s bei 42°C im Wasserbad hitzegeschockt. Es folgte eine weitere Inkubation auf Eis über 2min und die Zugabe von 250µl LB-Mediums, welches zuvor auf 42°C erwärmt wurde. Dieser Ansatz wurde für 60min bei 37°C in einem Schüttler (225rpm) inkubiert und anschließend 50µl auf eine LB-Agarplatte mit 100µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Vektor führt zu einer Ampicillinresistenz der transformierten E. Coli und damit zu ihrer Selektion. Am nächsten Tag konnte mit der Plasmidpräparation begonnen werden.

### 3.3.1.4 Restriktionsverdau durch Endonukleasen

Der Restriktionsverdau durch Endonukleasen dient dem Herausschneiden des DNA-Produktes aus dem Plasmid. Im gleichen Rahmen kann der psiCHECK™-2-Vektor mitverdaut werden, damit Vektor und DNA-Produkt die gleichen Schnittstellen aufweisen. Dies ermöglicht im Anschluss eine reibungslose Ligation.

Für den Verdau wurde folgender Ansatz für 90min im Wasserbad bei 37°C inkubiert:

Puffer (10x)	5µl
BSA	0,5µl
Restriktionsenzym XHO	0,5µl

Restriktionsenzym NOT	0,5µl
DNA-Produkt	4µg
nukleasefreies Wasser	ad 50µl

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine Gelelektrophorese (110V, 90min) durchgeführt, um die entstandenen DNA-Fragmente aufzutrennen. Die Aufreinigung aus dem Gel erfolgte mit dem Monarch DNA Gel Extraction Kit (BioLaps) nach Herstellerangabe.

### 3.3.2 Klonierung in den psiCHECK™-2-Vektor

#### 3.3.2.1 Ligation und Transformation

Zur Dephosphorylierung und Ligation des geschnittenen Vektors wurde das Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (Roche) angewendet.

Folgender Reaktionsansatz wurde für 10min bei 37°C dephosphoryliert:

Vector DNA	1µg
rAPid Alkaline Phosphatase Buffer, 10x conc.	2µl
rAPid Alkaline Phosphatase (1U)	1µl
nukleasefreies Wasser	ad 20µl

Die Ligation erfolgte im 3:1 Verhältnis von Insert zu Vektor, sodass sich der folgende Ansatz ergab:

Vector DNA (6273bp)	170ng
Insert DNA (866bp)	70,41ng
DNA Dilution Buffer, 5x	2ul
Wasser (nukleasefrei)	ad 10µl
T4 DNA Ligation Buffer, 2x	10ul
T4 DNA Ligase	1ul

Nach einer 5-minütigen Reaktionszeit bei Raumtemperatur konnte mit der Hitzeschock-Transformation begonnen werden. Hierbei wurden 50µl NEB 10-β Competent E. Coli vorsichtig auf Eis aufgetaut, 3µl der Plasmid-DNA hinzugegeben und durch vorsichtiges Schwenken miteinander vermischt. Die Inkubation auf Eis für 30min wurde durch einmaliges Hitzeschocken bei 42°C für 30s beendet. Es folgte eine erneute Inkubation auf Eis für 5min. Den Bakterien wurde 950µl SOC-Medium hinzugefügt und für 1h im Schüttler (225rpm, 37°C) inkubiert. 200µl dieses Ansatzes wurden auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Folgetag wurde mit der Plasmidpräparation begonnen.

### 3.3.3 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese der miR125a-Bindestellen im Vektor erfolgte mittels QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Als Substrat wurde das Klonierungsplasmid eingesetzt.

Folgender Reaktionsansatz wurde zur PCR-Amplifikation angesetzt:

10x Reaktionspuffer	5µl
Plasmid	100ng
Oligonukleotid-Primer forward	0,5µl
Oligonukleotid-Primer reverse	0,5µl
dNTP Mix	1µl
QuikSolution Reagent	15µl
QuickChange Lightning Enzym	1µl
nukleasefreies Wasser	ad 50µl

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach initialer Denaturierung über 2min bei 95°C durch 18 Zyklen:

- 1) 20s bei 95°C
- 2) 10s bei 60°C
- 3) 30s/kb des Plasmides bei 68°C

Die finale Elongation erfolgte bei 68°C für 5min. Final wurde dem PCR Produkt 2µl Dpn I-Restriktionsenzym hinzugegeben. Dieses Enzym fragmentiert nicht methylierte DNA und damit nur die nicht mutierte DNA, da eine Methylase in den E. Coli Bakterien die

Plasmide methylierte. Der Dpn I-Verdau erfolgte bei 37°C im Wasserbad für 15min. Via Hitzeschocktransformation wurde das Plasmid in XL10-Gold Ultracompetent Cells eingebracht und vermehrt. Es folgte die Plasmidpräparation und Sequenzierung.

### 3.3.4 Plasmidpräparation und DNA-Sequenzierung

Einzelne Kolonien wurden von den LB-Agarplatten gepickt und über Nacht im Schüttler (225rpm, 37°C) in 3mL bzw. 100mL LB-Medium + 0,1% Ampicillin aufbereitet. Für kleinere DNA-Mengen wurde das Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kid (Qiagen) und für größere DNA-Mengen das Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega) zur Plasmidpräparation nach Herstellerprotokoll angewendet. Nach einer alkalischen Zellyse wurde die DNA durch mehrere Waschvorgänge über eine Silikamembran aufgereinigt und in Wasser eluiert. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte am NanoDrop 2000 spectrophotometer. Bei reiner DNA liegt der Quotient der Messungen (260/280) bei 1,8. Die Plasmide wurde von MWG eurofins genomics sequenziert und die Sequenzen über den PubMed BLAST-Algorithmus überprüft.

## 3.4 Transiente Transfektion durch Elektroporation

### 3.4.1 Transiente Transfektion von HUVECs

Für die transiente Transfektion von miR-125a und verschiedenen siRNAs in HUVECs wurde das Neon electroporation system (Life Technologies) angewendet. Die benötigte Zellzahl wurde in 100µl Spitzen mit 50nM einer prä-miR-125a oder prä-miR-NC bzw. 100nM einer Anti-VE-Cadherin-siRNA oder Kontroll-siRNA durch einen Impuls (1250V, 30ms) transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen in ECGM ohne Antibiose + 10% FCS und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> entsprechend dem Versuchsaufbau (s. Tabelle) inkubiert.

<b>Tabelle 10: Versuchsaufbauten mit HUVECs</b>				
Wenn nicht gepoolt transfiziert wurde, wurden immer mindestens Duplikate verwendet.				
<b>Versuch</b>	<b>Zellzahl</b>	<b>Medium-volumen</b>	<b>Dauer</b>	<b>Methodik</b>
statische Versuche in 6-Well-Platten	300.000/Well	1,9mL ECGM + 10% FCS im Well	24h	qRT-PCR WesternBlot

statische Versuche in 12-Well-Platten	200.000/Well	0,9mL ECGM + 10% FCS im Well	24h 48h	qRT-PCR Durchflusszytometrie
statische Versuche in 24-Well-Platten	200.000/Well	0,9mL ECGM + 10% FCS im Well	24h	Immunfluoreszenzfärbung
Permeabilitätsassay (gepoolt)	300.000/ Zellkultureinsatz	0,9mL ECGM + 10% FCS, davon 200µl pro Zellkultureinsatz	72h	Boyden-Kammer / ELISA

### 3.4.2 Dualer Luciferase-Reportergen-Assay

In Triplikaten wurden 100.000 HEK-293 Zellen mit 1µg des klonierten psiCheck™-2-Plasmids und 50nM der hsa-miR-125a in 10µl Spitzen ko-transfiziert. Das Elektroporationsprogramm bestand aus 2 Impulsen (20ms, 1150V). Anschließend wurden die Zellen für 40h mit 490µl HEK Medium ohne Antibiose in 24-Well-Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Zur luminometrischen Messung der Reporter-Luciferase Aktivität wurde das Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) verwendet. Die geernteten Zellen wurden in 20µl DMEM resuspendiert, wovon 15µl in eine 96-Well-Platte überführt wurden. In gleicher Menge wurde das Dual Glo Reagent zur Lyse der geernteten Zellen hinzugegeben und für 10min lichtgeschützt inkubiert. Im FliterMax F3 konnte die Aktivität der konstant exprimierten Firefly-Luciferase luminometrisch gemessen werden. Hierbei handelt es sich um die Kontroll-Luciferase. Die ko-transfizierte miR125a führt bei einer direkten Regulation zur Degradierung der mRNA. Die Renilla-Luciferase-Aktivität ist von dieser Regulation abhängig, denn nur bei nicht-degradierter mRNA ist ihre Luciferase-Aktivität nach Zugabe von 15µl Dual Glo Stop and Glo Reagent und lichtgeschützter Inkubation (10min) messbar. Die Renilla-Luciferase-Aktivität stellt in Bezug auf die Firefly-Luciferase-Aktivität ein Maß für die direkte Regulation durch die miR-125a dar.

### **3.4.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie**

Die Transfektionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie am Attune Acoustic Focusing Cytometer bestimmt. Hierbei wurden 200.000 HUVECs mit 50nM Cy3 dye-labeled Pre-miR Negative Control (Cy3) gemäß Protokoll transfiziert und für 48 Stunden in einer 12-Well-Platte inkubiert. Die Messung erfolgte nach standardgemäßem Ernten der Zellen in 1ml PBS.

Zur Messung wurde das Cy3-Fluorochrom durch den Laser bei 488nm angeregt. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte im Fluoreszenzkanal BL-2 mit einem 575nm/24nm Emissionsfilter. Die Auswertung erfolgte mittels Attune Cytometric Software Version 1.2 (Applied Biosystems).

## **3.5 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.5.1 Gewinnung von Gesamtprotein und Proteinbestimmung**

Zur Gewinnung von Proteingesamtextrakten wurde der RIPA Lysis and Extraction Buffer (Thermo Fisher Scientific) unter Zugabe von 1% Protease- und Phosphatase-Inhibitor (Cell Signaling Technologies) verwendet. Das Zellmedium wurde verworfen und die Zellen mit 200µl eisgekühltem RIPA-Buffer für 5min auf Eis und danach für 30min bei 4°C auf einer Wippe inkubiert. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen lysiert und in ein 1,5ml Gefäß überführt. Die Proben wurden dreimal für 30s, mit jeweils 30s Pause auf Eis, im Ultraschallbad behandelt und erneut für 5min auf Eis gestellt.

Zur Trennung von Protein und Zellrückständen wurde zentrifugiert (16.100 xg, 10min bei 4°C) und nur der Überstand weiterverwendet. Die Proteinbestimmung erfolgt am FilterMax F3 mittels des Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), basierend auf der Biuret-Reaktion. Im alkalischen Milieu reduzieren Proteine  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$ , welches mit Bicinchoninsäure photometrisch-detektierbare Komplexe ausbildet. Zu 10µl der Probe wurden 200µl der BCA Reagenz, bestehend aus Reagenz A (Bicinchoninsäure) und B (Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1 hinzugefügt und für 30min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Die Messung erfolgte bei 562nm unter Verwendung einer Albumin-Standardkurve.

### **3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zum Auftrennen von Proteinen anhand ihrer Molekularmasse innerhalb eines elektrischen

Feldes. Alle Proteine wurden unter Zugabe von 5x Lämmli-Probenpuffer bei 95°C denaturiert. Der Lämmli-Probenpuffer umhüllt das Protein und führt so zu einer gleichmäßigen negativen Ladung des Proteins, welche sich proportional zur dessen Größe verhält. Für alle Elektrophoresen wurde ein 8%iges-Polyacrylamid-Trenngel verwendet. Die Elektrophorese wurde jeweils bei 110V über 2 Stunden durchgeführt.

### 3.5.3 Western-Blot und Immunodetektion

Zum Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran wurde das Trans-Blot Turbo Transfersystem (bio-rad) entsprechend den Herstellerprotokollen verwendet. Waschschritte der Membran wurden in TBST über 5min auf einer Rührplatte durchgeführt. Zur Immunodetektion wurde die Membran nach ihrer Aktivierung in Methanol zunächst gewaschen und dann für 1h auf der Rührplatte in 5% Milch in TBST zum Blockieren inkubiert. Die Inkubation im Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf einer Rührplatte (Tabelle 7). Um unspezifische Antikörperbindungen zu lösen, wurde die Membran gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte in 5% Milch gelöst in TBST für 2h bei Raumtemperatur auf der Rührplatte (Tabelle 7). Es folgten weitere Waschvorgänge. Am Sekundärantikörper ist eine Meerrettich-Peroxidase gebunden, welche eine Chemolumineszenzreaktion katalysieren kann. Zum Auslösen dieser Reaktion wurde das ECL western blot detection system (bio-rad) verwendet. Die Chemolumineszenz wurde durch eine CCD Kamera detektiert und die Bilder digital mit der Wasabi Imaging Software aufgenommen. Die Quantifizierung der Banden erfolgte über Image J.

## 3.6 Immunfluoreszenzfärbungen

HUVECs wurden gemäß dem oben genannten Protokoll transfiziert und für 24h inkubiert. Die Zellen wurden mit 500µl PBS + 0,1% Tween 20 gewaschen. Die Fixation erfolgte in eisgekühltem Methanol bei Raumtemperatur und anschließendem Waschschritt mit 500µl PBS + 0,1% Tween 20. Zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen wurde 10% Esel-Serum in PBST + 1% BSA + 22,52mg/ml Glycin für 30min bei Raumtemperatur verwendet. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht in 1:100 in PBST + 1% BSA bei 4°C. Es folgten 3 x Waschschritte mit 500µl PBS + 0,1% Tween 20. Die Inkubation des Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte 1:100 in PBST + 1% BSA für 2h. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Immunfluoreszenz mittels dem Olympus IX50 Inverted Phase Contrast Microscope dargestellt.

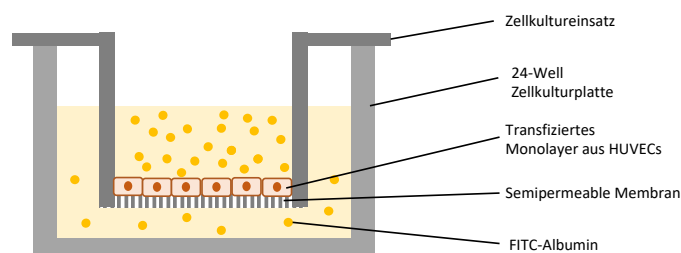
### 3.7 Inflammatorische Stimulation von HUVECs

300.000 HUVECs wurden in einer 6-Well Platte ausgesät und mit ECGM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin für 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Es erfolgte eine Stimulation mit 25ng/ml TNF- $\alpha$  und 50ng/ml IFN- $\gamma$  für 4h. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die HUVECs weiter prozessiert.

### 3.8 Permeabilitätsassay

In einer 24-Well-Platte wurden Zellkultureinsätze (Porengröße 0,4 $\mu$ m, Greiner Bio-one) verwendet, sodass sich ein oberes und ein unteres Kompartiment ergab. Das untere Kompartiment wurde mit 800 $\mu$ l und das obere Kompartiment mit 200 $\mu$ l ECGM + 10% FCS ohne Antibiose befüllt und für 30min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Die HUVECs aus jeweils einer Nabelschnur wurden mit pre-miR-125a/pre-miR-NC bzw. Anti-VE-Cadherin-siRNA/Anti-NC-siRNA transfiziert und in 900 $\mu$ l Medium ohne Antibiose resuspendiert. 200 $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden als Ersatz für die 200 $\mu$ l Medium im Zellkultureinsatz ausgesät. Es ergaben sich jeweils 5 Ansätze mit miR-125a oder Anti-VE-Cadherin-siRNA bzw. Negativkontrolle. Eine Stimulation mit 25ng/ml TNF- $\alpha$  erfolgte 48h nach der Transfektion für 24h. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde das Medium im unteren Kompartiment gewechselt und 10 $\mu$ g eines mit Fluoreszeini-sothiocyanat konjugierten BSA (FITC-BSA) in den Zellkultureinsatz gegeben. Nach 30min wurde im Doppelansatz 50 $\mu$ l des Mediums aus dem unteren Kompartiment entnommen. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte im FilterMax F3 im "Fluorescence Intensity read mode".



#### Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zum Permeabilitätsassay

Ein Zellkultureinsatz im Well einer Zellkulturplatte schafft zwei Kompartimente. In das obere Kompartiment wurde FITC-Albumin zugegeben, welches über eine semipermeable Membran bedeckt mit einer Einzellschicht aus transfizierten HUVECs ins untere Kompartiment diffundieren kann. Die fluorometrische Messung erfolgte nach 30min.



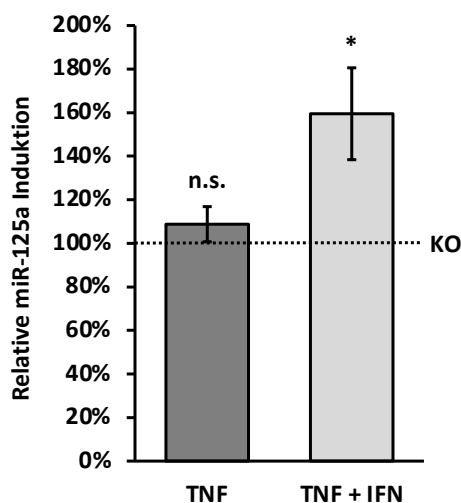
### 3.9 Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden mindestens als drei unabhängige Experimente durchgeführt, wobei die jeweilige Anzahl als n angegeben ist. Die in-silico-Vorhersage potenzieller miRNA-Bindestellen erfolgte über TargetScan7.2 (<http://www.targetscan.org>). Zur statistischen Auswertung wurde Microsoft Excel und Graphpad Prism Version 7.02 verwendet. Die Signifikanz wurde mit dem t-Test ermittelt und  $p < 0,05$  als Signifikanzniveau definiert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Inflammatorische Stimulation führt zur Induktion der miR-125a in primären HUVECs

Aktuelle Studien zeigten erhöhte Konzentrationen der miR-125a im Blut von Patienten mit akut vaskulären Erkrankungen, wie Sepsis oder Apoplex [62, 69, 70]. Zur Beantwortung der Fragestellung, ob miR-125a in Endothelzellen durch eine akute Inflamationsreaktion induzierbar ist, wurde die miR-125a Expression in mit Zytokinen stimulierten HUVECs über qRT-PCR quantifiziert (Abbildung 4).



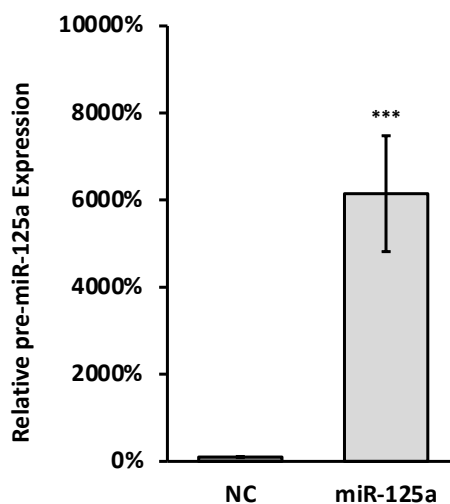
**Abbildung 4: Inflammatorische Stimulation von HUVECs führt zu einer Induktion der miR-125a-Expression**

Primäre humane Endothelzellen (HUVECs) wurden ausgesät und für 48h inkubiert. Es erfolgte entweder eine Stimulation mit 25ng/ml TNF- $\alpha$  über 4h (TNF) oder eine Doppelstimulation mit 25ng/ml TNF- $\alpha$  und 50ng/ml IFN- $\gamma$  für 4h (TNF + IFN). Im Anschluss wurde RNA isoliert und die miR125a durch qRT-PCR quantifiziert. Dargestellt ist die miR-125a Expression der stimulierten HUVECs in Relation zur unstimulierten Kontrolle (KO). TNF: MW  $\pm$  SEM, n = 4, p = 0,72, nicht signifikant, TNF + IFN: MW  $\pm$  SEM, n = 7, \*p < 0,05.

Dabei zeigte sich eine signifikante Induktion der miR-125a nach Doppelstimulation mit den beiden inflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (+59,5%  $\pm$  21,1%, n = 7, \*p < 0,05). Eine einfache Stimulation von HUVECs mit TNF- $\alpha$  konnte keine signifikante Änderung der miR-125a-Expression hervorrufen (+8,8%  $\pm$  13,9%, n = 4, p = 0,72, nicht signifikant).

## 4.2 Transfektion mit pre-miR-125a führt zur Überexpression der miR-125a

Um die molekularen Effekte der miR-125a in HUVECs näher untersuchen zu können, wurden diese mittels Elektroporation einer pre-miR-125a transfiziert, was zu einer Überexpression der miR-125a führte (Abbildung 5).

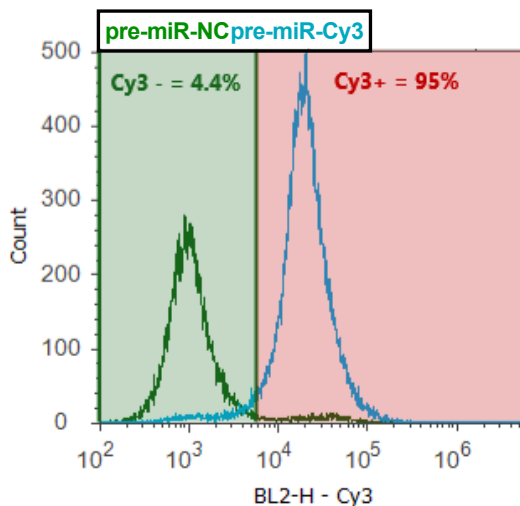


**Abbildung 5: Transfektion mit pre-miR-125a führt zu einer Überexpression der miR-125a**

Primäre humane Endothelzellen (HUVECs) wurden mit pre-miR-125a (miR-125a) bzw. einer Negativkontrolle (NC) transfiziert. 24h nach Transfektion bzw. 6h nach einer Stimulation mit 25ng/ml TNF- $\alpha$  wurde RNA isoliert und die miRNA durch qPCR quantifiziert. Dargestellt ist die relative Expression der miR-125a in Bezug auf die Negativkontrolle. MW  $\pm$  SEM, n = 6, \*\*\*p < 0,001.

Die Transfektion von HUVECs mit pre-miR-125a führte zu einer hochsignifikanten intrazellulären Zunahme der miR-125a im Vergleich zu mit pre-miR-NC transfizierten Zellen. Dabei war die Expression von miR-125a um 6047,8%  $\pm$  1214,5% erhöht (MW  $\pm$  SEM, n = 6, \*\*\*p < 0,001).

Der Nachweis der Transfektionseffizienz erfolgte über eine mit Cy3 konjugierte miRNA-Negativkontrolle in der Durchflusszytometrie. Es zeigte sich eine Transfektionseffizienz von 95% (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Transfektionseffizienz in primären Humanen Endothelzellen (HUVECs)**

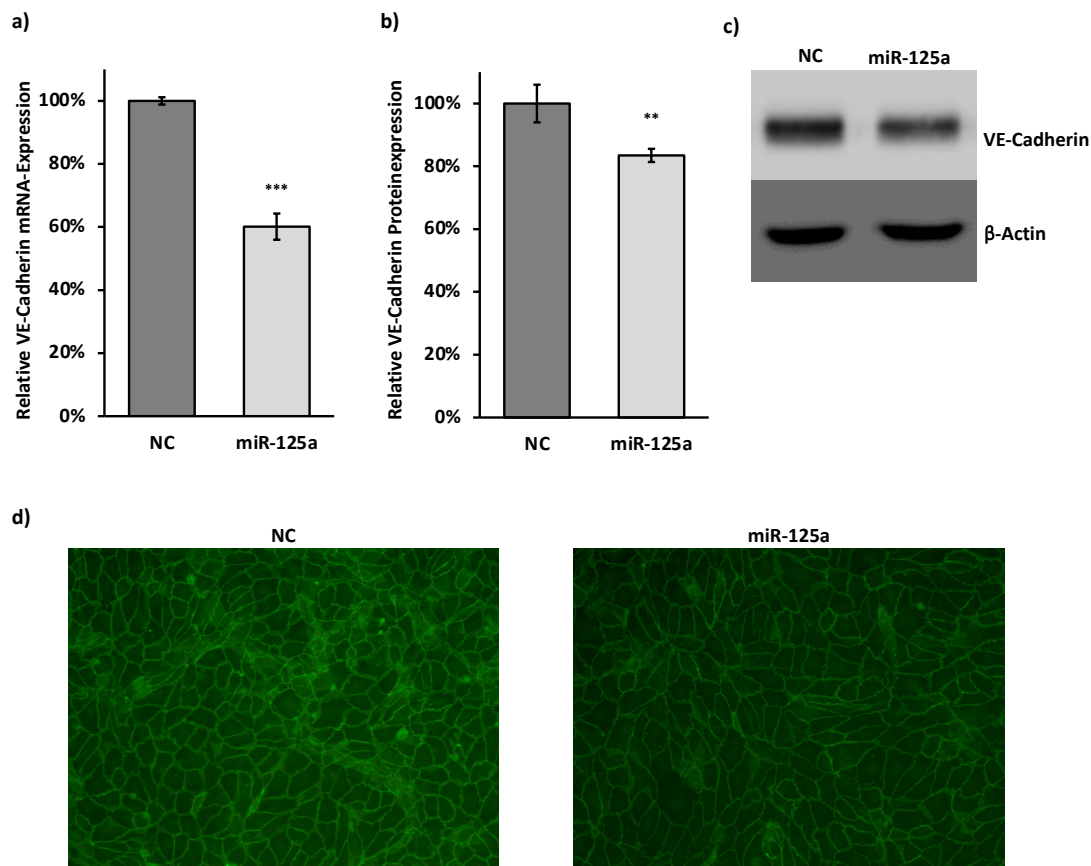
Primäre humane Endothelzellen wurden mit einer Cy3 konjugierten miRNA-Negativkontrolle transfiziert und für 48h inkubiert. Die Messung der Transfektionseffizienz erfolgte durchflusszytometrisch. Es zeigte sich eine Transfektionseffizienz von über 95%. Exemplarisch dargestellt ist das Histogramm eines Versuchs.

### 4.3 Identifikation potenzieller Zielgene der miR-125a

Um zu untersuchen, welche Zielgene durch eine endotheliale miR-125a Induktion beeinflusst werden könnten, wurde eine in-silico Analyse von Transkriptomdaten durchgeführt. Dabei wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe das endotheliale Transkriptom nach miR-125a Überexpression mittels Next Generation Sequencing (NGS) untersucht. Die signifikant regulierten Signalwege GO\_regulation of cell adhesion and KEGG\_adherens junctions wurden in einer Gene Set Enrichment Analysis identifiziert (NCBI GEO database [71], accession: GSE196161 [4]). Als potenzielle Zielgene der miR-125a, die an der Regulation der endothelialen Barrierefunktion beteiligt sein könnten, wurde Gene definiert, die sowohl a) Teil der für die Barrierefunktion wichtigen Signalwege waren und b) eine in-silico vorhergesagte Bindestelle für miR-125a im 3'-UTR des Transkripts beinhalteten. Dabei wurden die potenziellen Zielgene der miR-125a VE-Cadherin und TGFBR2 in dieser Arbeit weiter untersucht. Es fanden sich zwei putative Bindestellen der miR-125a in der 3'-UTR VE-Cadherins sowie eine nicht kanonische Bindestelle der miR-125a in der 3'-UTR des TGFBR2 (Tabelle 11).



eine verminderte Expression sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene bestätigt werden.



**Abbildung 7: Validierung VE-Cadherins als Target der miR-125a**

Primäre humane Endothelzellen wurden mit pre-miR-125a bzw. pre-miR-NC transfiziert. Es erfolgte eine inflammatorische Stimulation mit 25ng/ml TNF- $\alpha$  für 6h. 24h nach Transfektion wurde RNA isoliert und mittels qRT-PCR quantifiziert bzw. Gesamtprotein gewonnen und durch Western-Blot-Analysen untersucht. Eine Überexpression der miR-125a führt zu einer Induktion VE-Cadherins auf mRNA und Proteinebene.

a) VE-Cadherin mRNA-Expression in transfizierten HUVECs. Die Darstellung erfolgt in Relation zur Negativkontrolle (NC). MW  $\pm$  SEM, n = 6, \*\*\*p < 0,001

b) VE-Cadherin Protein-Expression in transfizierten HUVECs. Als Referenz wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Die Darstellung erfolgt in Relation zur Negativkontrolle (NC). MW  $\pm$  SEM, n = 5, \*\*p < 0,01

c) Nachweis der VE-Cadherin Proteinexpression im Western Blot.

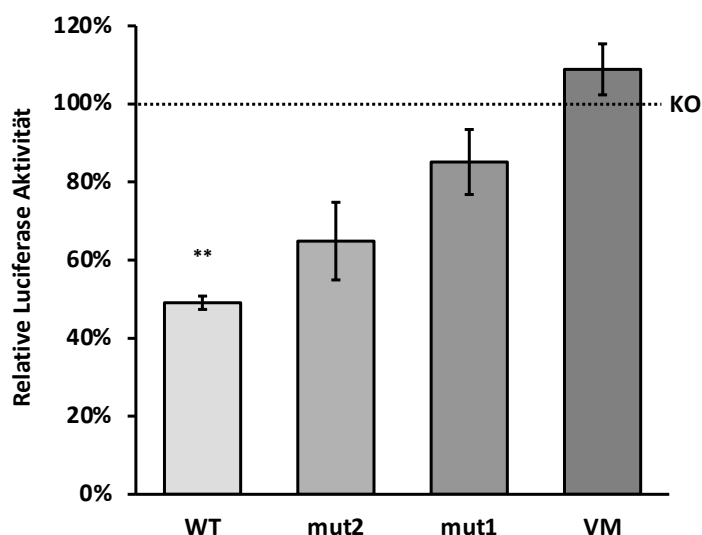
d) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung der VE-Cadherin Oberflächenexpression in HUVECs 24h nach Transfektion mit pre-miR-125a bzw. pre-miR-NC.

#### 4.4.2 Nachweis einer direkten Regulation VE-Cadherins durch miR-125a

Zum Nachweis einer direkten Interaktion der miR-125a wurde die 3'-UTR VE-Cadherins in ein psiCHECK™-2 -Reporterkonstrukt kloniert und ein Luciferase Assay durchgeführt (Abbildung 8).

Eine Ko-Transfektion mit pre-miR-125a führt zu einer signifikanten Reduktion der Luciferase Aktivität im Vergleich zur Transfektion mit pre-miR-NC um  $50,9\% \pm 1,7\%$  (MW  $\pm$  SEM, n = 5,  $**p < 0,01$ ). Die VE-Cadherin 3'-UTR verfügt über zwei putative miR-125a Bindestellen, welche beide eine Rolle bei der Regulation spielen könnten. Durch eine gerichtete Mutagenese konnten die beiden Bindestellen einzeln validiert und eine Vollmutante ohne miR-125a Bindestelle generiert werden.

Die Mutation der ersten Bindestelle (mut1) führt zu einer Reduktion der gemessenen Luciferase Aktivität um  $14,9\% \pm 8,3\%$  (MW  $\pm$  SEM, n = 5, p = 0,16, nicht signifikant). Die Mutation der zweiten Bindestelle (mut2) vermindert die gemessene Luciferase Aktivität um  $-35,1\% \pm 9,9\%$  (MW  $\pm$  SEM, n = 5, p = 0,11, nicht signifikant). Passend dazu führte auch die Mutation beider Bindestellen zu keiner signifikanten Änderung der Luciferase Aktivität ( $+8,9\% \pm 6,5\%$ , MW  $\pm$  SEM, n = 5, p = 0,19, nicht signifikant). Daraus ergibt sich eine direkte Regulation VE-Cadherins durch die miR-125a. Es sind beide in-silico detektierten Bindestellen an der Regulation beteiligt, wobei das Fehlen beider Bindestellen eine komplette Aufhebung der Regulation zur Folge hat.



**Abbildung 8: Nachweis einer direkten Regulation der VE-Cadherin-Expression durch miR-125a**

Die 3'-UTR VE-Cadherins wurde in den psiCHECK™-2-Reportervektor kloniert. 40h nach Ko-Transfektion des Reportervektors mit pre-miR-125a bzw. pre-miR-NC in HEK-293 Zellen wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. Untersucht wurden der Wildtyp, als auch die

Reporterkonstrukte nach Mutation der miR-125a Bindestellen (WT: Wildtyp, mut2: mutierte Bindestelle 2, mut1: mutierte Bindestelle 1, VM: Vollmutante). Es zeigt sich eine direkte Regulation der 3'-UTR VE-Cadherins durch die miR-125a über beide Bindestellen. Dargestellt ist die Renilla-Luciferase-Aktivität in Relation zur Firefly-Luciferase. MW  $\pm$  SEM, n = 5, WT: \*\*p < 0,01, mut2: n.s., mut1: n.s., VM: n.s.

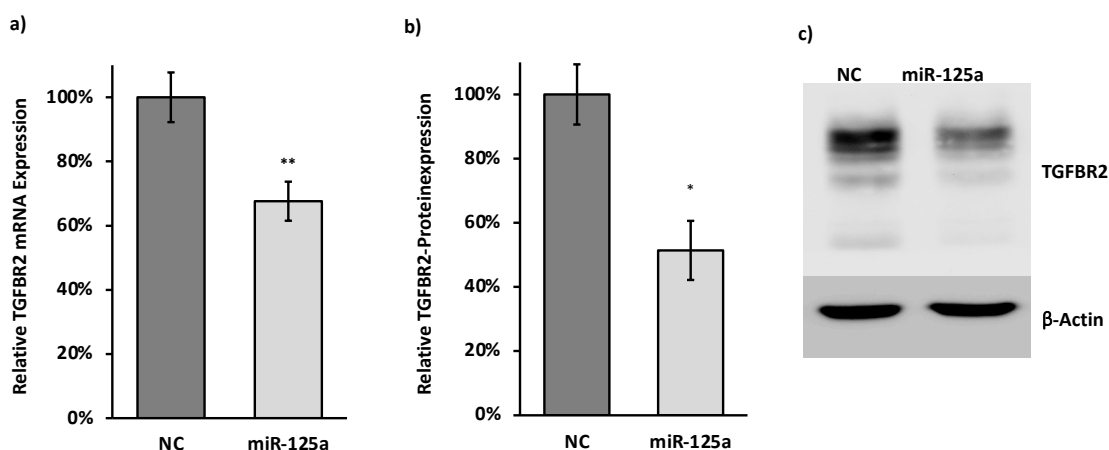
## 4.5 Der TGFBR2 stellt ein indirektes Target der miR-125a dar

### 4.5.1 Validierung TGFBR2 als potenzielles Zielgen der miR-125a

Um das potenzielle Zielgen TGFBR2 experimentell zu validieren, wurden HUVECs mit miR-125a bzw. einer Negativkontrolle transfiziert und deren mRNA bzw. das Gesamtprotein weiter untersucht.

Eine Überexpression der miR-125a in HUVECs vermindert die mRNA-Expression des TGFBR2 um  $+32,4\% \pm 5,6\%$  (MW  $\pm$  SEM, n=6, \*\*p < 0,01). Ebenso reduziert sie die Proteinexpression des TGFBR2 um  $+51,7\% \pm 9,2\%$  (MW  $\pm$  SEM, n=6, \*\*p < 0,01).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der miR-125a mit einer Verminderung der TGFBR2-Expression einher geht. Dieses Ergebnis zeigt sich sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene (Abbildung 9). Um eine direkte Interaktion der miR-125a nachzuweisen wurden im nächsten Schritt die 3'-UTR des TGFBR2-Gens mittels Reporteragen-Analysen untersucht.



**Abbildung 9: TGFBR2 mRNA und Proteinexpression in HUVECs nach Transfektion mit pre-miR-125a**

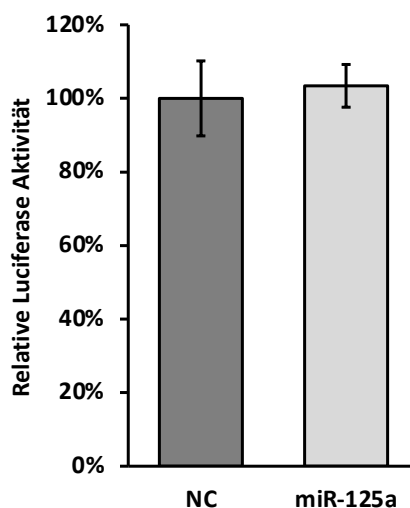
Primäre humane Endothelzellen wurden mit pre-miR-125a bzw. pre-miR-NC transfiziert. Es erfolgte eine inflammatorische Stimulation mit 25ng/ml TNF für 6h. 24h nach Transfektion wurde RNA isoliert und mittels qRT-PCR quantifiziert bzw. Gesamtprotein gewonnen und durch Western-Blot-Analyse untersucht. Eine Überexpression der miR-125a führt zu einer Induktion des TGFBR2 auf mRNA und Proteinebene.



- a) TGFBR2 mRNA-Expression in transfizierten HUVECs. Die Darstellung erfolgt in Relation zur Negativkontrolle (NC). MW  $\pm$  SEM, n = 6, \*\*p < 0,01
- b) TGFBR2 Protein-Expression in transfizierten HUVECS. Als Referenz wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Die Darstellung erfolgt in Relation zur Negativkontrolle (NC). MW  $\pm$  SEM, n = 5, \*p < 0,05.
- c) Repräsentative Western Blot Darstellung der TGFBR2 Protein Expression in HUVECs.

#### 4.5.2 Ausschluss einer direkten Regulation des TGFBR2 durch miR-125a

MiRNA können ihren Effekt sowohl über eine direkte als auch über eine indirekte Regulation ausüben. Zum Nachweis einer direkten Interaktion der miR-125a mit der 3'UTR des TGFBR2-Transkripts erfolgte ein Luciferase-Assay nach Klonierung der 3'UTR in den psiCHECK™-2-Reportervektors.



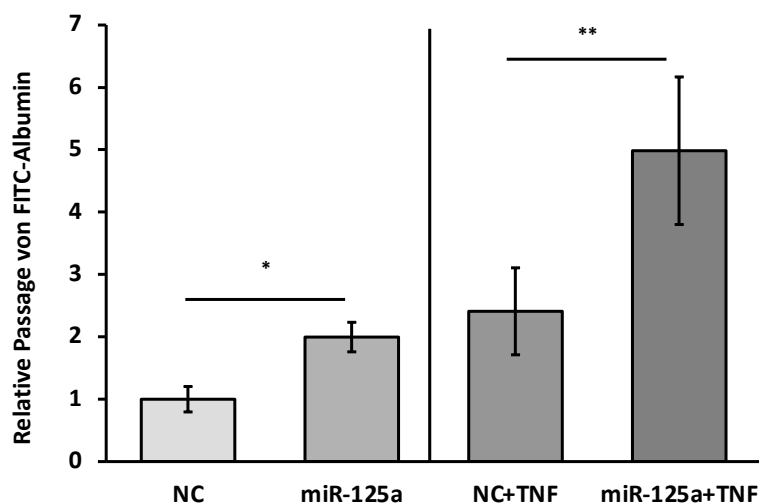
**Abbildung 10: Ausschluss einer direkten Regulation der TGFBR2-Expression durch miR-125a**

Die 3'-UTR VE-Cadherins wurde in den psiCHECK2-Reportervektor kloniert. 40h nach Kotransfektion des Reportervektors mit pre-miR-125a bzw. pre-miR-NC in HEK-293 wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. Es zeigt sich keine direkte Regulation der 3'-UTR des TGFBR2 durch die miR-125a. Dargestellt ist die Renilla-Luciferase-Aktivität in Relation zur Firefly-Luciferase. MW  $\pm$  SEM, n = 3, p = 0,545, nicht signifikant.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Luciferase Aktivität nach Ko-Transfektion mit pre-miR-125a im Vergleich zur Ko-Transfektion mit pre-miR-NC (+3,4%  $\pm$  5,8% (MW  $\pm$  SEM), n = 3, nicht signifikant). Die Expression des TGFBR2 unterliegt somit keiner direkten Regulation durch miR-125a. Es kann von einer indirekten Regulation ausgegangen werden, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

#### 4.6 Eine MiR-125a Überexpression führt zur erhöhten FITC-Albumin Passage über das endotheliale *Monolayer*

Im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens kommt es unter anderem zum Abbau von Adhäsionsverbindungen zwischen Endothelzellen mit Integritätsverlust der endothelialen Barriere [23]. Da miR-125a kann durch eine inflammatorische Stimulation induziert werden und könnte durch die direkte posttranskriptionale Repression von VE-Cadherin zur Ausbildung eines hyperpermeablen Phänotyps in der akuten Inflammationsreaktion beitragen. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde die transendotheliale Passage von FITC-konjugiertem Albumin (FITC-BSA) über eine Einzelzellschicht mit miR-125a transfizierter HUVECs gemessen.



**Abbildung 11: Überexpression der miR-125a führt zu einer gesteigerten FITC-Albumin Passage**

Eine Einzelzellschicht aus mit pre-miR-125a bzw. pre-miR-NC transfizierten HUVECs wurde auf einem Zellkultureinsatz kultiviert. Bei den mit pre-miR-125a transfizierten HUVECs zeigte sich eine erhöhte Durchlässigkeit für FITC-konjugiertes Albumin 72h nach Transfektion. Dieser Effekt konnte sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach einer inflammatorischen Stimulation mit TNF- $\alpha$  für 24h nachgewiesen werden. Die Darstellung erfolgt normalisiert auf NC. MW  $\pm$  SEM, n = 6, \* p < 0,05 bzw. \*\* p < 0,01.

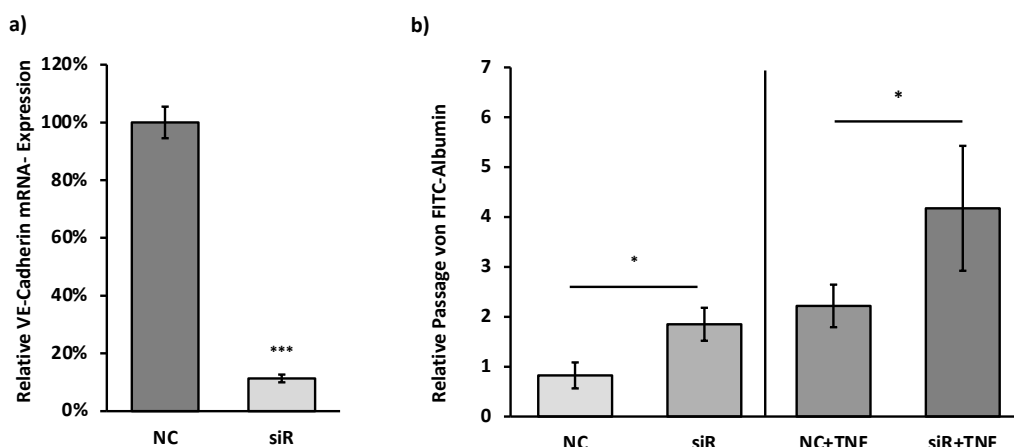
Eine miR-125a Überexpression führte zu einem Anstieg der FITC-Albumin-Passage um 99,7%  $\pm$  23,7% (MW  $\pm$  SEM, n = 6, \*p < 0,05). Im Rahmen einer inflammatorischen Stimulation mit TNF- $\alpha$  kam es zu einer Steigerung der FITC-Albumin-Passage um 128,0%  $\pm$  27,6% (MW  $\pm$  SEM, n = 6, \*\*p < 0,01). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von miR-125a zu einer gesteigerten FITC-Albumin Passage führt, was als Zeichen des endothelialen Integritätsverlusts gedeutet werden kann. Eine

zusätzliche inflammatorische TNF- $\alpha$  Stimulation verstärkt den hyperpermeablen Phänotyp.

#### 4.7 Spezifischer Knock-Down von VE-Cadherin in HUVECs führt zu einer gesteigerten FITC-Albumin Passage über das endotheliale *Monolayer*

Nachdem gezeigt wurde, dass eine Überexpression der miR-125a zu einer Verminderung der endothelialen Integrität führt und dass die miR-125a über direktes *Targeting* die Expression von VE-Cadherin hemmt, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob der hyperpermeable Phänotyp tatsächlich über VE-Cadherin vermittelt wird.

Dazu wurde der FITC-Albumin Flux über das endotheliale *Monolayer* nach Expressionshemmung von VE-Cadherin nach Transfektion einer spezifischen VE-Cadherin siRNA bestimmt.



**Abbildung 12: Ein Knock-Down von VE-Cadherin durch RNA-Interferenz führt zu einer Erhöhung der FITC-Albumin-Passage.**

Eine Einzelzellschicht aus mit VE-Cadherin-siRNA bzw. siR-NC transfizierten HUVECs wurden auf einem Zellkultureinsatz kultiviert.

a) Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der VE-Cadherin mRNA Expression nach Transfektion mit VE-Cadherin-siRNA. Die Darstellung erfolgt in Relation zur Negativkontrolle (NC). MW  $\pm$  SEM, n = 5, \*\*\* p < 0,001.

b) Nach Hemmung der VE-Cadherin Expression durch Transfektion einer VE-Cadherin-siRNA (siR) konnte eine erhöhte Durchlässigkeit von FITC-Albumin über das konfluente HUVEC-*Monolayer* 72h nach Transfektion gemessen werden. Dieser Effekt konnte sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach einer inflammatorischen Stimulation mit TNF- $\alpha$  für 24h nachgewiesen werden. Die Darstellung erfolgt in Relation zur Negativkontrolle (NC). MW  $\pm$  SEM, n = 5, \* p < 0,05.

Zur Kontrolle des spezifischen Knock-Downs VE-Cadherins durch eine VE-Cadherin-siRNA wurde die VE-Cadherin-mRNA-Expression nach Transfektion mit siRNA bestimmt. Es zeigte sich eine signifikant verminderte VE-Cadherin mRNA-Expression in den mit VE-Cadherin-siRNA transfizierten Zellen ( $-88,7\% \pm 1,3\%$  (MW  $\pm$  SEM),  $n = 6$ ,  $***p < 0,001$ ).

Die Transfektion mit VE-Cadherin-siRNA führte zu einer signifikant erhöhten Passage des FITC-Albumins über die unstimulierte endotheliale Einzelzellschicht ( $+85,0\% \pm 30,2\%$  (MW  $\pm$  SEM),  $n = 5$ ,  $*p < 0,05$ ). Auch eine inflammatorische Stimulation mit TNF- $\alpha$  führte in den mit VE-Cadherin-siRNA transfizierten HUVECs zu einer signifikant gesteigerten FITC-Albumin Passage im Vergleich zur stimulierten Negativkontrolle ( $+82,4\% \pm 23,9\%$  (MW  $\pm$  SEM),  $n = 5$ ,  $*p < 0,05$ ). Es konnte gezeigt werden, dass ein spezifischer Knock-Down von VE-Cadherin zu einer gesteigerten FITC-Albumin Passage führt, was durch eine zusätzliche inflammatorische TNF- $\alpha$  Stimulation verstärkt werden kann. Somit wird der hyperpermeable Phänotyp bei Zunahme der intrazellulären miR-125a Konzentration durch eine direkte Regulation VE-Cadherins hervorgerufen.

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der miR-125a in Endothelzellen während einer akut inflammatorischen Reaktion zu untersuchen, mögliche Zielgene zu evaluieren und deren Rolle bei der Vermittlung der endothelialen Barrierenfunktionsstörung zu charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass eine inflammatorische Stimulation die miR-125a in HUVECs induziert und über direkte Regulation von VE-Cadherin die endotheliale Permeabilität erhöht. Über eine indirekte Interaktion führte eine Überexpression der miR-125a zu einer verminderten Expression des TGFBR2, der über den TGF- $\beta$  Signalweg auch in der Regulation der endothelialen Barrierefunktion beteiligt ist [36, 39, 73].

Zur Induktion der miR-125a in HUVECs war eine Doppelstimulation mit zwei inflammatorischen Zytokinen – TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  – notwendig, da eine alleinige Stimulation mit TNF- $\alpha$  keinen entsprechenden Effekt hervorrufen konnte. Die Biogenese und Expression von miRNAs unterliegen einer engen Regulation [74], sodass die Induktion der miR-125a möglicherweise erst bei einer schweren Inflammationsreaktion erfolgt. Im inflammatorischen Milieu ist normalerweise ein „Cocktail“ an Zytokinen zu finden, der die Inflammationsreaktion steuert. Die Kombination aus INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  konnte dabei bereits die Induktion einer anderen proinflammatorischen miRNAs (miR-155) in Endothelzellen hervorrufen [75, 76].

Andere Studien konnten eine gesteigerte miR-125a Expression in Endothelzellen unter Hypoxie [77], nach Aktivierung des PPAR $\gamma$ -Signalweges [78] oder durch oxidiertes *low-density* Lipoprotein (oxLDL) [79] nachweisen. Ionisierende Strahlung hingegen führte zu einer Verminderung der miR-125a [80]. Konträre Ergebnisse zeigten sich in humanen zerebralen Endothelzellen. Sowohl eine Stimulation mit oxLDL [81], als auch eine Doppelstimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  reduzierte die Expression der miR-125a und führte über die Ausbildung dichter Adhäsionsverbindungen zur Stabilisierung der Blut-Hirnschranke [67, 70]. Dabei ist bereits bekannt, dass die Funktion und auch Expression einer miRNA in unterschiedlichen Zelltypen oftmals variiert [52].

Für die miR-125a sind kontextspezifisch unterschiedliche Funktionen beschrieben [61]. So agiert sie beispielsweise durch die Regulation von Onkogenen, wie der ERBB-Gene als Tumorsuppressor [60, 61]. Andererseits vermindert die miR-125a die Expression des Transkriptionsfaktors p53 und übt damit einen anti-apoptotischen Effekt aus [60]. Eine Reduktion der miR-125a Expression zeigte sich im NSCLC (nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom), HCC (hepatozelluläres Karzinom), Mammakarzinom und in

Medulloblastomen [60, 67] sowie eine Überexpression der miR-125a in myeloproliferativen Erkrankungen, wie Leukämien aber auch in Lymphomen [60]. Ferner spielt die miR-125a eine Rolle bei inflammatorischen Erkrankungen [60, 62], wie etwa durch ihren Einfluss auf die Funktion regulatorischer T-Zellen [63] und die Differenzierung von Makrophagen [82]. Eine differentielle Expression der miR-125a konnte auch bei Autoimmunerkrankungen [61, 63] wie Lupus [62, 64, 83], Morbus Crohn [65, 66], der Rheumatoide Arthritis [68] und Multipler Sklerose [66, 67] dokumentiert werden. Im Rahmen von vaskulären Erkrankungen zeigt sich exemplarisch eine Überexpression der miR-125a bei ischämischen Schlaganfällen [70]. Passend dazu wurde gezeigt, dass die miR-125a den vasomotorischen Regulator Endothelin-1 reprimiert und auf diese Weise die Vasomotorik des Gefäßsystems beeinflusst [84]. Neuere Studien zeigten darüber hinaus eine vermehrte Expression der miR-125a im Blut-Plasma von Sepsis Patienten oder Patienten mit ARDS in Korrelation zum APACHE II und SOFA Score, sodass hier Rückschluss auf die Schwere der Erkrankung gezogen werden konnte [62, 69].

Während einer akuten Inflammation kommt es unter anderem zu einer Funktionsstörung des Endothels, welche sich auch in einer Barrierefunktionsstörung äußert. Eine Konsequenz ist die Ausbildung von Ödemen und der Verlust von vasalen Blutbestandteilen ins Interstitium, was eine maßgebliche Rolle in der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen, wie der Sepsis spielt [1, 12]. Aufgrund der erhöhten Expression der miR-125a im Blut von Patienten mit akut vaskulären Erkrankungen und der in dieser Arbeit nachgewiesenen endothelialen Induktion der miR-125a durch inflammatorische Aktivierung lag die Hypothese nahe, dass die miR-125a an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und Barrierefunktionsstörung beteiligt sein könnte.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde die endotheliale Integrität nach Überexpression der miR-125a anhand der FITC-Albumin Passage über das endotheliale *Monolayer* quantifiziert, wobei sich eine Hyperpermeabilität manifestierte. An sich erfolgt der Transport von Blutbestandteilen über die endotheliale Barriere entweder parazellulär, über die endothelialen Kontakte zwischen den Zellen, oder transzellulär, durch die Endothelzellen [85]. Während eines inflammatorischen Geschehens überwiegt der parazelluläre Transport durch Auflösung der interendothelialen Zellkontakte, wie *Adherens Junctions* und *Tight Junctions* [27]. Da die Gefäßstruktur in unterschiedlichen Organen variiert, unterscheidet sich die Zusammensetzung dieser Zellverbindungen zwischen den Geweben [86]. So sorgen *Adherens Junctions* für die Stabilität zwischen Zellen und kontrollieren den Übertritt von größeren Plasmabestandteilen. *Tight Junctions*

hingegen kontrollieren die Permeabilität für kleinere Moleküle und Ionen und sind entscheidend an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt, da sie eine engere Verbindung mit geringer Permeabilität vermitteln [27, 87].

In dieser Arbeit konnte eine direkte Regulation der VE-Cadherin Expression durch die miR-125a mit Auswirkung auf die endotheliale Permeabilität gezeigt werden. Die Rolle VE-Cadherins als Bestandteil der *Adherens Junctions* an der Vermittlung der endothelialen Barriere ist bereits ausführlicher Bestandteil der wissenschaftlichen Untersuchungen gewesen [88].

*Adherens Junctions* basieren auf einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen homophilen Bindung zweier VE-Cadherin-Moleküle zwischen benachbarten Zellen und der Interaktion mit dem Zytoskelett über Catenine [22]. Sie kontrollieren die endotheliale Permeabilität und Barrierefunktion sowie die Migration, während der Angiogenese, Inflammation und Wundheilung [21]. Als regulative Mechanismen der *Adherens Junctions* sind die Phosphorylierung und Internalisierung, die Endozytose und der lysosomale Abbau von Adhäsionsproteinen anzuführen [31, 32]. Zur Regulation von Adhäsionsproteinen, wie VE-Cadherin, durch miRNA ist jedoch wenig bekannt.

Young et al. konnten zeigen, dass die miR-27a VE-Cadherin direkt reguliert und während der Angiogenese vermindert exprimiert wird, was die vaskuläre Permeabilität erhöht [89]. Außerdem stellt VE-Cadherin ein direktes Zielgen der miR-22 dar. Überexpression der miR-22 in Endothelzellen führt zur Inflammation und fehlerhaften vaskulären Entwicklung von Zebrafischen [90]. Bei der direkten Regulation der 3'-UTR VE-Cadherins durch die miR-125a mit Erhöhung der vaskulären Permeabilität nach Induktion durch eine akute inflammatorische Reaktion, könnte es sich um einen weiteren regulativen Mechanismus der endothelialen Barriere handeln. Da eine miRNA ihre Funktion oft über Regulation vieler Zielgene potenziert [5], ist VE-Cadherin als ein einzelnes Zielgen eines größeren funktionellen Netzwerks zu verstehen. Die Identifikation weiterer Zielgene ist notwendig, um die Rolle der miR-125a bei der Vermittlung der endothelialen Dysfunktion und Hyperpermeabilität während einer akuten Inflammation besser verstehen zu können.

Als weiteres potenzielles Zielgen der miR-125a wurde der TGFBR2 als Teil des TGF- $\beta$  Signalweges untersucht. Eine Aktivierung des TGF- $\beta$  Signalweges in Endothelzellen führt unter anderem zu einer gesteigerten vaskulären Permeabilität [40-44]. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein Knock-Down des TGFBR2 zu einem besseren Überleben in einem Mausmodell der Sepsis führt [91].

In der experimentellen Validierung zeigte sich, dass eine Überexpression der miR-125a in HUVECs zu einer verminderten Expression des TGFBR2 führte. Allerdings konnte keine direkte Interaktion mit der 3'-UTR durch die miR-125a nachgewiesen werden, sodass hier von einer sekundären Regulation ausgegangen werden kann.

Analog zu diesen Ergebnissen konnten andere Arbeitsgruppen einen inversen Zusammenhang der miR-125a-Expression und der TGF- $\beta$ 1-Produktion zeigen. So führt eine Überexpression der miR-125a in PSMCs (*pulmonary artery smooth muscle cells*) zu einer reduzierten TGF- $\beta$ 1 Expression [92] beziehungsweise die Inhibition der miR-125a mittels anti-miR in Makrophagen zu einer 3-fach erhöhten Expression von TGF- $\beta$ 1 [93].

Interessanterweise ist bereits hinreichend beschrieben, dass VE-Cadherin mit transmembranösen Kinase-Rezeptoren, wie VEGFR2, VEGFR3, TGFBR2 und FGFR1 interagieren und so die Aktivierung weiterer intrazelluläre Signalkaskaden initiieren kann [87, 94]. Bereits 2008 konnten Rudini et al. einen Einfluss VE-Cadherins auf das TGF- $\beta$  *Signaling* in Endothelzellen zeigen. Hier führt VE-Cadherin zur Rekrutierung des TGFBR2 und fördert womöglich über die Bindung des TGFBR1 die Aktivierung des intrazellulären TGF- $\beta$  Signalwegs, sodass im Umkehrschluss eine Verminderung VE-Cadherins zu einer abgeschwächten Aktivierung des TGF- $\beta$  Signalwegs in Endothelzellen führen könnte [73].

Genauere Untersuchungen zur direkten und indirekten Regulation des TGF- $\beta$  Signalweges durch die miR-125a sollten weiter untersucht werden, da die miR-125a über den TGF- $\beta$  Signalweges einen Einfluss auf essentielle zelluläre Funktionen, wie die Differenzierung, Proliferation und Motilität von Zellen ausüben könnte [6].

## 5.1 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre humane Endothelzellen aus Umbilicalvenen (HUVECs) verwendet. Somit stammen sämtliche erhobene Daten aus in-vitro und nicht aus in-vivo Beobachtung anhand einer Zellentität. Die Übertragbarkeit von Effekten in HUVECs auf humane Endothelzellen muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Die Induktion der miR-125a nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  kann als in-vitro Modell der akuten Inflammationsreaktion betrachtet werden und ist jedoch nur bedingt mit der pathophysiologischen Situation einer akuten Inflammation im humanen Gewebe mit einer Vielzahl an Zytokinen zu vergleichen [1]. Der Nachweis, dass auch eine Inkubation mit einem Stimulans, das die in-vivo Situation besser abbilden könnte (wie



zum Beispiel das Serum von septischen Patienten), die miR-125a in Endothelzellen induziert, steht derzeit noch aus.

Zur Objektivierung der endothelialen Integrität wurde die FITC-Albumin Passage über ein endotheliales *Monolayer* in einer Boyden Kammer gemessen. Dieses Verfahren eignet sich, um den Übertritt molekularer Bestandteile über das endotheliale *Monolayer* abzubilden, jedoch ist hierbei keine Unterscheidung zwischen para- und transzellulärem Transport möglich. Interessant wäre eine Bestätigung der erhobenen Daten mittels anderer Verfahren zur Messung der endothelialen Barriere Funktion, wie beispielsweise der ECIS (*electric cell-substrate impedance sensing*).

Es mangelt an einem klinisch verwendbaren Biomarker, der schnell und möglichst spezifisch, akut inflammatorische Krankheitsbilder, wie die Sepsis diagnostizieren und als prognostischer Parameter dienen kann [12, 95]. Auf Grund ihrer leichten Messbarkeit in Körperflüssigkeiten und ihrer Spezifität für Gewebe oder Zelltypen, wurde in den letzten Jahren immer wieder die Verwendung von miRNA als klinische Biomarker diskutiert. Unterschiedliche Ergebnisse einzelner Arbeitsgruppen und einen Mangel an standardisierten Protokollen stellen hier mögliche Hindernisse dar [16, 59]. Eine potenzielle Verwendung der miR-125a als Biomarker ergab sich bereits für ischämische Schlaganfälle [70]. Zudem fand sich eine Korrelation der HBV Viruslast und -replikation zur Expression der miR-125a, oder die Assoziation der miR-125a Überexpression mit der Insulinresistenz im Rattenmodell [60].

Da die miR-125a durch einen inflammatorischen Reiz induziert wird und die endotheliale Barriere schwächen kann, wäre auch hier eine Verwendung als Biomarker des *Vascular-Leakage*-Syndroms in der Sepsis durchaus denkbar. Erste Studien dazu wurden bereits veröffentlicht [62, 69], eine Bestätigung dieser Ergebnisse in einem größeren Patientenkollektiv steht jedoch noch aus.

Die Identifizierung von miR-125a als Vermittler der inflammatorisch bedingten endothelialen Barrierefunktionsstörung macht ihren Einsatz als potenzielles therapeutisches Zielmolekül in akut entzündlichen Erkrankungen denkbar. Eine selektive Blockade von miR-125a ist in Form von anti-sense miRNAs bereits in der Zellkultur bekannt, wurde bislang aber noch nicht in einem humanen Setting erprobt. Zur weiteren Charakterisierung des miR-125a abhängigen Effekts auf die endotheliale Barrierefunktion sind deshalb weitere Studien mit dem Versuch einer spezifischen miR-125a Blockade in-vitro notwendig, um einen möglichen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung des hyperpermeablen Gefäßsystems in akut inflammatorischen Krankheitsbildern zu untersuchen.

## Literaturverzeichnis

- [1] R. S. Hotchkiss, L. L. Moldawer, S. M. Opal, K. Reinhart, I. R. Turnbull, and J. L. Vincent, "Sepsis and septic shock," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 2, p. 16045, Jun 30 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.45.
- [2] E. Dejana and F. Orsenigo, "Endothelial adherens junctions at a glance," *J Cell Sci*, vol. 126, no. Pt 12, pp. 2545-9, Jun 15 2013, doi: 10.1242/jcs.124529.
- [3] A. G. Vassiliou, A. Kotanidou, I. Dimopoulou, and S. E. Orfanos, "Endothelial Damage in Acute Respiratory Distress Syndrome," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 22, Nov 20 2020, doi: 10.3390/ijms21228793.
- [4] M. B. Müller *et al.*, "Cell-Crossing Functional Network Driven by microRNA-125a Regulates Endothelial Permeability and Monocyte Trafficking in Acute Inflammation," (in English), *Frontiers in Immunology*, Original Research vol. 13, 2022-March-24 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.826047.
- [5] S. Kreth, M. Hubner, and L. C. Hinske, "MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine," *Anesth Analg*, Sep 14 2017, doi: 10.1213/ANE.0000000000002444.
- [6] K. Tzavlaki and A. Moustakas, "TGF-beta Signaling," *Biomolecules*, vol. 10, no. 3, Mar 23 2020, doi: 10.3390/biom10030487.
- [7] L. M. Coussens and Z. Werb, "Inflammation and cancer," *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 860-7, Dec 19-26 2002, doi: 10.1038/nature01322.
- [8] R. Medzhitov, "Inflammation 2010: new adventures of an old flame," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 771-6, Mar 19 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006.
- [9] C. Nathan, "Points of control in inflammation," *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 846-52, Dec 19-26 2002, doi: 10.1038/nature01320.
- [10] R. Medzhitov, "Origin and physiological roles of inflammation," *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 428-35, Jul 24 2008, doi: 10.1038/nature07201.
- [11] E. V. Dolmatova, K. Wang, R. Mandavilli, and K. K. Griendling, "The effects of sepsis on endothelium and clinical implications," *Cardiovasc Res*, Mar 26 2020, doi: 10.1093/cvr/cvaa070.
- [12] C. Ince *et al.*, "The Endothelium in Sepsis," *Shock*, vol. 45, no. 3, pp. 259-70, Mar 2016, doi: 10.1097/SHK.0000000000000473.
- [13] M. Bauer, H. Gerlach, T. Vogelmann, F. Preissing, J. Stiefel, and D. Adam, "Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019- results from a systematic review and meta-analysis," *Crit Care*, vol. 24, no. 1, p. 239, May 19 2020, doi: 10.1186/s13054-020-02950-2.
- [14] M. Singer *et al.*, "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)," *JAMA*, vol. 315, no. 8, pp. 801-10, Feb 23 2016, doi: 10.1001/jama.2016.0287.
- [15] S. David and F. M. Brunkhorst, "[Sepsis-3 : What has been confirmed in therapy?]," *Internist (Berl)*, vol. 58, no. 12, pp. 1264-1271, Dec 2017, doi: 10.1007/s00108-017-0338-5. Sepsis-3 : Was ist gesichert in der Therapie?
- [16] S. Hirschberger *et al.*, "Identification of suitable controls for miRNA quantification in T-cells and whole blood cells in sepsis," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 15735, Oct 31 2019, doi: 10.1038/s41598-019-51782-w.
- [17] S. M. K. Kingsley and B. V. Bhat, "Role of microRNAs in sepsis," *Inflamm Res*, vol. 66, no. 7, pp. 553-569, Jul 2017, doi: 10.1007/s00011-017-1031-9.
- [18] S. M. Opal and T. van der Poll, "Endothelial barrier dysfunction in septic shock," *J Intern Med*, vol. 277, no. 3, pp. 277-293, Mar 2015, doi: 10.1111/joim.12331.
- [19] J. F. Bermejo-Martin, M. Martin-Fernandez, C. Lopez-Mestanza, P. Duque, and R. Almansa, "Shared Features of Endothelial Dysfunction between Sepsis and Its Preceding Risk Factors (Aging and Chronic Disease)," *J Clin Med*, vol. 7, no. 11, Oct 30 2018, doi: 10.3390/jcm7110400.

- [20] M. Y. Radeva and J. Waschke, "Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier," *Acta Physiol (Oxf)*, vol. 222, no. 1, Jan 2018, doi: 10.1111/apha.12860.
- [21] J. Seebach, N. Klusmeier, and H. Schnittler, "Autoregulatory "Multitasking" at Endothelial Cell Junctions by Junction-Associated Intermittent Lamellipodia Controls Barrier Properties," *Front Physiol*, vol. 11, p. 586921, 2020, doi: 10.3389/fphys.2020.586921.
- [22] D. Mehta and A. B. Malik, "Signaling mechanisms regulating endothelial permeability," *Physiol Rev*, vol. 86, no. 1, pp. 279-367, Jan 2006, doi: 10.1152/physrev.00012.2005.
- [23] P. Kumar, Q. Shen, C. D. Pivetti, E. S. Lee, M. H. Wu, and S. Y. Yuan, "Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation," *Expert Rev Mol Med*, vol. 11, p. e19, Jun 30 2009, doi: 10.1017/S1462399409001112.
- [24] Y. Zhuang, H. Peng, V. Mastej, and W. Chen, "MicroRNA Regulation of Endothelial Junction Proteins and Clinical Consequence," *Mediators Inflamm*, vol. 2016, p. 5078627, 2016, doi: 10.1155/2016/5078627.
- [25] J. Gavard, "Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship," *Cell Adh Migr*, vol. 8, no. 2, pp. 158-64, 2014. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25422846>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4049861/pdf/cam-8-158.pdf>.
- [26] D. Mehta, K. Ravindran, and W. M. Kuebler, "Novel regulators of endothelial barrier function," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 307, no. 12, pp. L924-35, Dec 15 2014, doi: 10.1152/ajplung.00318.2014.
- [27] N. Wettschureck, B. Strlic, and S. Offermanns, "Passing the Vascular Barrier: Endothelial Signaling Processes Controlling Extravasation," *Physiol Rev*, vol. 99, no. 3, pp. 1467-1525, Jul 1 2019, doi: 10.1152/physrev.00037.2018.
- [28] D. Kugelman, L. T. Rotkopf, M. Y. Radeva, A. Garcia-Ponce, E. Walter, and J. Waschke, "Histamine causes endothelial barrier disruption via Ca(2+)-mediated RhoA activation and tension at adherens junctions," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 13229, Sep 5 2018, doi: 10.1038/s41598-018-31408-3.
- [29] C. Cerutti and A. J. Ridley, "Endothelial cell-cell adhesion and signaling," *Exp Cell Res*, vol. 358, no. 1, pp. 31-38, Sep 1 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.06.003.
- [30] K. J. Green, A. Jaiganesh, and J. A. Broussard, "Desmosomes: Essential contributors to an integrated intercellular junction network," *F1000Res*, vol. 8, 2019, doi: 10.12688/f1000research.20942.1.
- [31] Y. H. Chan, H. H. Harith, D. A. Israf, and C. L. Tham, "Differential Regulation of LPS-Mediated VE-Cadherin Disruption in Human Endothelial Cells and the Underlying Signaling Pathways: A Mini Review," *Front Cell Dev Biol*, vol. 7, p. 280, 2019, doi: 10.3389/fcell.2019.00280.
- [32] F. Orsenigo *et al.*, "Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo," *Nat Commun*, vol. 3, p. 1208, 2012, doi: 10.1038/ncomms2199.
- [33] M. Giannotta, M. Trani, and E. Dejana, "VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity," *Dev Cell*, vol. 26, no. 5, pp. 441-54, Sep 16 2013, doi: 10.1016/j.devcel.2013.08.020.
- [34] V. Kuppers, M. Vockel, A. F. Nottebaum, and D. Vestweber, "Phosphatases and kinases as regulators of the endothelial barrier function," *Cell Tissue Res*, vol. 355, no. 3, pp. 577-86, Mar 2014, doi: 10.1007/s00441-014-1812-1.
- [35] S. Xiong *et al.*, "IL-1beta suppression of VE-cadherin transcription underlies sepsis-induced inflammatory lung injury," *J Clin Invest*, vol. 130, no. 7, pp. 3684-3698, Jul 1 2020, doi: 10.1172/JCI136908.
- [36] M. J. Goumans, Z. Liu, and P. ten Dijke, "TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction," *Cell Res*, vol. 19, no. 1, pp. 116-27, Jan 2009, doi: 10.1038/cr.2008.326.

- [37] A. Chaikuad and A. N. Bullock, "Structural Basis of Intracellular TGF-beta Signaling: Receptors and Smads," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 8, no. 11, Nov 1 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a022111.
- [38] R. W. Padgett, "TGFbeta signaling pathways and human diseases," *Cancer Metastasis Rev*, vol. 18, no. 2, pp. 247-59, 1999, doi: 10.1023/a:1006325408261.
- [39] A. S. Antonov *et al.*, "Regulation of endothelial barrier function by TGF-beta type I receptor ALK5: potential role of contractile mechanisms and heat shock protein 90," *J Cell Physiol*, vol. 227, no. 2, pp. 759-71, Feb 2012, doi: 10.1002/jcp.22785.
- [40] Q. Lu, E. O. Harrington, H. Jackson, N. Morin, C. Shannon, and S. Rounds, "Transforming growth factor-beta1-induced endothelial barrier dysfunction involves Smad2-dependent p38 activation and subsequent RhoA activation," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 101, no. 2, pp. 375-84, Aug 2006, doi: 10.1152/jappphysiol.01515.2005.
- [41] Y. H. Lee, U. S. Kayyali, A. M. Sousa, T. Rajan, R. J. Lechleider, and R. M. Day, "Transforming growth factor-beta1 effects on endothelial monolayer permeability involve focal adhesion kinase/Src," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 37, no. 4, pp. 485-93, Oct 2007, doi: 10.1165/rcmb.2006-0439OC.
- [42] W. Shen *et al.*, "Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin and claudin-5 is associated with TGF-beta1-induced permeability of centrally derived vascular endothelium," *Eur J Cell Biol*, vol. 90, no. 4, pp. 323-32, Apr 2011, doi: 10.1016/j.ejcb.2010.10.013.
- [43] G. Tossetta *et al.*, "IL-1beta and TGF-beta weaken the placental barrier through destruction of tight junctions: an in vivo and in vitro study," *Placenta*, vol. 35, no. 7, pp. 509-16, Jul 2014, doi: 10.1016/j.placenta.2014.03.016.
- [44] E. A. Ye, L. Liu, and J. J. Steinle, "miR-15a/16 inhibits TGF-beta3/VEGF signaling and increases retinal endothelial cell barrier proteins," *Vision Res*, vol. 139, pp. 23-29, Oct 2017, doi: 10.1016/j.visres.2017.07.007.
- [45] V. Neudecker, K. S. Brodsky, S. Kreth, A. A. Ginde, and H. K. Eltzschig, "Emerging Roles for MicroRNAs in Perioperative Medicine," *Anesthesiology*, vol. 124, no. 2, pp. 489-506, Feb 2016, doi: 10.1097/ALN.0000000000000969.
- [46] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*," *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 843-54, Dec 3 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
- [47] D. P. Bartel, "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 281-97, Jan 23 2004, doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- [48] A. Kozomara, M. Birgaoanu, and S. Griffiths-Jones, "miRBase: from microRNA sequences to function," *Nucleic Acids Res*, vol. 47, no. D1, pp. D155-D162, Jan 8 2019, doi: 10.1093/nar/gky1141.
- [49] M. Esteller, "Non-coding RNAs in human disease," *Nat Rev Genet*, vol. 12, no. 12, pp. 861-74, Nov 18 2011, doi: 10.1038/nrg3074.
- [50] L. C. Hinske, P. A. Galante, W. P. Kuo, and L. Ohno-Machado, "A potential role for intragenic miRNAs on their hosts' interactome," *BMC Genomics*, vol. 11, p. 533, Oct 1 2010, doi: 10.1186/1471-2164-11-533.
- [51] Y. Lee *et al.*, "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II," *EMBO J*, vol. 23, no. 20, pp. 4051-60, Oct 13 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.
- [52] S. Hirschberger, L. C. Hinske, and S. Kreth, "MiRNAs: dynamic regulators of immune cell functions in inflammation and cancer," *Cancer Lett*, vol. 431, pp. 11-21, May 22 2018, doi: 10.1016/j.canlet.2018.05.020.
- [53] O. Goertz *et al.*, "Peptide XIB13 reduces capillary leak in a rodent burn model," *Microvasc Res*, vol. 93, pp. 98-104, May 2014, doi: 10.1016/j.mvr.2014.04.003.
- [54] Y. Lee *et al.*, "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing," *Nature*, vol. 425, no. 6956, pp. 415-9, Sep 25 2003, doi: 10.1038/nature01957.
- [55] R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, and B. R. Cullen, "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs," *Genes Dev*, vol. 17, no. 24, pp. 3011-6, Dec 15 2003, doi: 10.1101/gad.1158803.

- [56] D. P. Bartel, "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions," *Cell*, vol. 136, no. 2, pp. 215-33, Jan 23 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- [57] B. P. Lewis, I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, and C. B. Burge, "Prediction of mammalian microRNA targets," *Cell*, vol. 115, no. 7, pp. 787-98, Dec 26 2003, doi: 10.1016/s0092-8674(03)01018-3.
- [58] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, and S. Diederichs, "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation," *Nat Cell Biol*, vol. 11, no. 3, pp. 228-34, Mar 2009, doi: 10.1038/ncb0309-228.
- [59] C. E. Condrat *et al.*, "miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis," *Cells*, vol. 9, no. 2, Jan 23 2020, doi: 10.3390/cells9020276.
- [60] N. Potenza and A. Russo, "Biogenesis, evolution and functional targets of microRNA-125a," *Mol Genet Genomics*, vol. 288, no. 9, pp. 381-9, Sep 2013, doi: 10.1007/s00438-013-0757-5.
- [61] Y. M. Sun, K. Y. Lin, and Y. Q. Chen, "Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts," *J Hematol Oncol*, vol. 6, p. 6, Jan 15 2013, doi: 10.1186/1756-8722-6-6.
- [62] D. Zhao, S. Li, J. Cui, L. Wang, X. Ma, and Y. Li, "Plasma miR-125a and miR-125b in sepsis: Correlation with disease risk, inflammation, severity, and prognosis," *J Clin Lab Anal*, vol. 34, no. 2, p. e23036, Feb 2020, doi: 10.1002/jcla.23036.
- [63] W. Pan *et al.*, "MiR-125a targets effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis," *Nat Commun*, vol. 6, p. 7096, May 12 2015, doi: 10.1038/ncomms8096.
- [64] X. Zhao *et al.*, "MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus," *Arthritis Rheum*, vol. 62, no. 11, pp. 3425-35, Nov 2010, doi: 10.1002/art.27632.
- [65] C. M. Sun, J. Wu, H. Zhang, G. Shi, and Z. T. Chen, "Circulating miR-125a but not miR-125b is decreased in active disease status and negatively correlates with disease severity as well as inflammatory cytokines in patients with Crohn's disease," *World J Gastroenterol*, vol. 23, no. 44, pp. 7888-7898, Nov 28 2017, doi: 10.3748/wjg.v23.i44.7888.
- [66] H. M. Lee, T. S. Kim, and E. K. Jo, "MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation," *BMB Rep*, vol. 49, no. 6, pp. 311-8, Jun 2016, doi: 10.5483/bmbrep.2016.49.6.056.
- [67] A. Reijerkerk *et al.*, "MicroRNAs regulate human brain endothelial cell-barrier function in inflammation: implications for multiple sclerosis," *J Neurosci*, vol. 33, no. 16, pp. 6857-63, Apr 17 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3965-12.2013.
- [68] P. Cheng and J. Wang, "The potential of circulating microRNA-125a and microRNA-125b as markers for inflammation and clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis patients," *J Clin Lab Anal*, vol. 34, no. 8, p. e23329, Aug 2020, doi: 10.1002/jcla.23329.
- [69] S. Li, D. Zhao, J. Cui, L. Wang, X. Ma, and Y. Li, "Correlation of microRNA-125a/b with acute respiratory distress syndrome risk and prognosis in sepsis patients," *J Clin Lab Anal*, vol. 34, no. 3, p. e23098, Mar 2020, doi: 10.1002/jcla.23098.
- [70] S. Tiedt *et al.*, "RNA-Seq Identifies Circulating miR-125a-5p, miR-125b-5p, and miR-143-3p as Potential Biomarkers for Acute Ischemic Stroke," *Circ Res*, vol. 121, no. 8, pp. 970-980, Sep 29 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311572.
- [71] R. Edgar, M. Domrachev, and A. E. Lash, "Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository," *Nucleic Acids Res*, vol. 30, no. 1, pp. 207-10, Jan 1 2002, doi: 10.1093/nar/30.1.207.
- [72] V. Agarwal, G. W. Bell, J. W. Nam, and D. P. Bartel, "Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs," *Elife*, vol. 4, Aug 12 2015, doi: 10.7554/eLife.05005.

- [73] N. Rudini *et al.*, "VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling," *EMBO J*, vol. 27, no. 7, pp. 993-1004, Apr 9 2008, doi: 10.1038/emboj.2008.46.
- [74] M. Ha and V. N. Kim, "Regulation of microRNA biogenesis," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 15, no. 8, pp. 509-24, Aug 2014, doi: 10.1038/nrm3838.
- [75] D. Yee, K. M. Shah, M. C. Coles, T. V. Sharp, and D. Lagos, "MicroRNA-155 induction via TNF-alpha and IFN-gamma suppresses expression of programmed death ligand-1 (PD-L1) in human primary cells," *J Biol Chem*, vol. 292, no. 50, pp. 20683-20693, Dec 15 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.809053.
- [76] M. A. Lopez-Ramirez *et al.*, "MicroRNA-155 negatively affects blood-brain barrier function during neuroinflammation," *FASEB J*, vol. 28, no. 6, pp. 2551-65, Jun 2014, doi: 10.1096/fj.13-248880.
- [77] L. C. Huber *et al.*, "Featured Article: microRNA-125a in pulmonary hypertension: Regulator of a proliferative phenotype of endothelial cells," *Exp Biol Med (Maywood)*, vol. 240, no. 12, pp. 1580-9, Dec 2015, doi: 10.1177/1535370215579018.
- [78] H. Kang *et al.*, "Negative regulation of NOD1 mediated angiogenesis by PPARgamma-regulated miR-125a," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 482, no. 1, pp. 28-34, Jan 1 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.032.
- [79] Z. Zhaolin *et al.*, "OxLDL induces vascular endothelial cell pyroptosis through miR-125a-5p/TET2 pathway," *J Cell Physiol*, vol. 234, no. 5, pp. 7475-7491, May 2019, doi: 10.1002/jcp.27509.
- [80] M. Wagner-Ecker, C. Schwager, U. Wirkner, A. Abdollahi, and P. E. Huber, "MicroRNA expression after ionizing radiation in human endothelial cells," *Radiat Oncol*, vol. 5, p. 25, Mar 26 2010, doi: 10.1186/1748-717X-5-25.
- [81] Q. Pan *et al.*, "MicroRNA-125a-5p alleviates the deleterious effects of ox-LDL on multiple functions of human brain microvessel endothelial cells," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 312, no. 2, pp. C119-C130, Feb 1 2017, doi: 10.1152/ajpcell.00296.2016.
- [82] S. Banerjee *et al.*, "miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation," *J Biol Chem*, vol. 288, no. 49, pp. 35428-36, Dec 6 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.426866.
- [83] X. Zhao *et al.*, "Triptolide ameliorates lupus via the induction of miR-125a-5p mediating Treg upregulation," *Int Immunopharmacol*, vol. 71, pp. 14-21, Jun 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2019.02.047.
- [84] D. Li *et al.*, "MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells," *J Hypertens*, vol. 28, no. 8, pp. 1646-54, Aug 2010, doi: 10.1097/HJH.0b013e32833a4922.
- [85] Y. Komarova and A. B. Malik, "Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways," *Annu Rev Physiol*, vol. 72, pp. 463-93, 2010, doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135833.
- [86] C. N. Duong and D. Vestweber, "Mechanisms Ensuring Endothelial Junction Integrity Beyond VE-Cadherin," *Front Physiol*, vol. 11, p. 519, 2020, doi: 10.3389/fphys.2020.00519.
- [87] M. G. Lampugnani, E. Dejana, and C. Giampietro, "Vascular Endothelial (VE)-Cadherin, Endothelial Adherens Junctions, and Vascular Disease," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 10, no. 10, Oct 1 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a029322.
- [88] G. Bazzoni and E. Dejana, "Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis," *Physiol Rev*, vol. 84, no. 3, pp. 869-901, Jul 2004, doi: 10.1152/physrev.00035.2003.
- [89] J. A. Young *et al.*, "Regulation of vascular leak and recovery from ischemic injury by general and VE-cadherin-restricted miRNA antagonists of miR-27," *Blood*, vol. 122, no. 16, pp. 2911-9, Oct 17 2013, doi: 10.1182/blood-2012-12-473017.

- [90] W. Gu *et al.*, "MicroRNA-22 regulates inflammation and angiogenesis via targeting VE-cadherin," *FEBS Lett*, vol. 591, no. 3, pp. 513-526, Feb 2017, doi: 10.1002/1873-3468.12565.
- [91] F. Ma, Z. Li, J. Cao, X. Kong, and G. Gong, "A TGFBR2/SMAD2/DNMT1/miR-145 negative regulatory loop is responsible for LPS-induced sepsis," *Biomed Pharmacother*, vol. 112, p. 108626, Apr 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108626.
- [92] Z. Cai *et al.*, "MiR-125a-5p ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by targeting the TGF-beta1 and IL-6/STAT3 signaling pathways," *Exp Mol Med*, vol. 50, no. 4, pp. 1-11, Apr 27 2018, doi: 10.1038/s12276-018-0068-3.
- [93] T. Chen *et al.*, "MicroRNA-125a-5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocyte/macrophages," *Cardiovasc Res*, vol. 83, no. 1, pp. 131-9, Jul 1 2009, doi: 10.1093/cvr/cvp121.
- [94] B. D. Cook, G. Ferrari, G. Pintucci, and P. Mignatti, "TGF-beta1 induces rearrangement of FLK-1-VE-cadherin-beta-catenin complex at the adherens junction through VEGF-mediated signaling," *J Cell Biochem*, vol. 105, no. 6, pp. 1367-73, Dec 15 2008, doi: 10.1002/jcb.21935.
- [95] M. Parlato and J. M. Cavaillon, "Host response biomarkers in the diagnosis of sepsis: a general overview," *Methods Mol Biol*, vol. 1237, pp. 149-211, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-1776-1\_15.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mich während der Entstehungsphase dieser Arbeit unterstützt und bereichert haben.

An erster Stelle geht mein Dank an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Dr. Simone Kreth für die Möglichkeit unter ihrer Leitung meine Dissertation verfassen zu können. Ohne ihr Vertrauen und die wissenschaftliche Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Martin Müller für seine stets geduldige Betreuung, fachlichen Anregungen und konstruktive Kritik sowie für die Unterstützung in beruflichen und persönlichen Angelegenheiten bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft und die angenehme sowie familiäre Arbeitsatmosphäre bedanken. Die technische und fachliche Unterstützung hat maßgeblich zum Erfolg der vorliegenden Arbeit beigetragen.

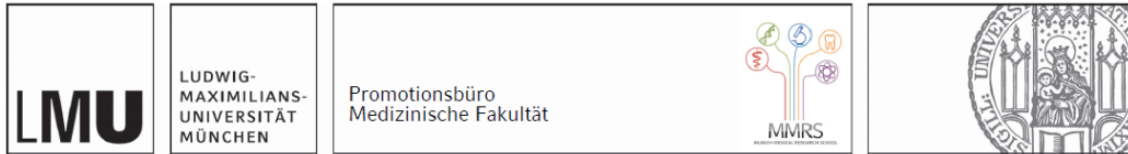
Mein Dank gilt auch dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) für die finanzielle Unterstützung und persönliche Förderung durch das strukturierte Promotionsstudium.

Mein größter Dank geht an meine Eltern und Großeltern für die uneingeschränkte und vertrauensvolle Unterstützung. Ohne sie wäre weder mein Studium noch die Arbeit an dieser Dissertation möglich gewesen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, welche in jeder Situation geduldig und ermutigend zu mir hielten. Insbesondere möchte ich mich bei Hannah Gildein bedanken, die in jeder Lebenslage mein größter Befürworter war.



## Affidavit



### Eidesstattliche Versicherung

Ließke, Leana Valena

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname

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

Micro-RNA-125a erhöht die endotheliale Permeabilität über direkte Interaktion mit VE-Cadherin  
und indirekte Interaktion mit dem TGF- $\beta$ -Rezeptor-2

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

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

München, 31.12.2023

Leana Valena Ließke

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

# Wissenschaftliche Veröffentlichung der Daten dieser Arbeit

## Originalarbeiten

1. Müller MB, Hübner M, Li L, Tomasi S, **Ließke V**, Effinger D, Hirschberger S, Pogoda K, Sperandio M and Kreth S (2022) Cell-Crossing Functional Network Driven by microRNA-125a Regulates Endothelial Permeability and Monocyte Trafficking in Acute Inflammation. *Front. Immunol.* 13:826047. doi: 10.3389/fimmu.2022.826047

## Abstracts/Poster

1. Müller MB, Hübner M, **Liesske V**, Li L, Kreth, S: MicroRNA-125a specific functional network increases endothelial permeability in acute inflammatory conditions. *Esicm Lives 2020. Intensive Care Med Exp 2020*;8:73. doi:10.1186/s40635-020-00354-8 (Poster)
2. Müller M, Hübner M, **Ließke V**, Kreth S: MicroRNA-125a erhöht die endotheliale Permeabilität durch direktes Targeting von VE-Cadherin. *A&I 7/8 2019 – WAT Abstracts (Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI, Würzburg, 15.02.-16.02.2019)*. (Abstract)