

Aus der

Klinik für Innere Medizin III- Gastroenterologie,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. F. Lammert

Zirkadiane Rhythmik zirkulierender microRNA bei gesunden Probanden

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

Vorgelegt von: Rebecca Elena Scheffen

geb. am 26.04.1991 in Leonberg

Für meine Eltern

Tag der Promotion: 11. November 2020

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichtersteller: Prof. Dr. med. Jochen G. Schneider

Prof. Dr. med. Eckart Meese

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
1.1	Zirkadiane Rhythmik zirkulierender miRs bei gesunden Probanden	5
1.2	Circadian rhythm of circulating miRs in healthy volunteers	6
2	Einleitung	7
2.1	Was sind miRs?	7
2.2	Vorkommen	10
2.3	miRs und Biomarker	11
2.4	miRs und die interzelluläre Kommunikation	11
2.5	miRs und der zirkadiane Rhythmus	13
2.6	Hypothese/ Fragestellung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Studien-Design	15
3.2	Probandenkollektiv	15
3.3	Materialgewinnung	16
3.4	Qualitätskontrollen	17
3.5	RNA-Extraktion	18
3.6	Reverse Transkription	19
3.7	Preamplifikation	20
3.8	Real-time PCR (qPCR)	22
3.9	Datenanalyse	23
4	Ergebnisse	27
4.1	Überblick	27
4.2	miRs mit relevanten Expressionslevel im Serum (Kategorie „high expression level“).	29
4.2.1	miRs mit Expressionsveränderungen	34
4.2.2	Vergleich Woche 1 und Woche 2	39
4.2.3	Vergleich mit dem Kooperationspartner Luxemburg	40

5 Diskussion	42
5.1 Zirkadianik	42
5.2 Ernährung.....	45
5.3 Physiologische Einflussfaktoren.....	49
5.4 Technische und methodische Herausforderungen.....	50
5.5 Abschließendes Statement/Schlussfolgerung.....	52
6 Abkürzungen	53
7 Abbildungs- und Diagrammverzeichnis.....	55
8 Tabellenverzeichnis	56
9 Literaturverzeichnis	57
10 Anhang	63
10.1 Liste der miRs aus hel-Gruppe.....	63
10.2 Rohwerte der Qualitätskontrollen	65
10.3 Routinelaboruntersuchung der Probanden.....	69
11 Danksagungen.....	82
12 Publikationen	83
13 Lebenslauf	84

1 Zusammenfassung

1.1 Zirkadiane Rhythmik zirkulierender miRs bei gesunden Probanden

MicroRNAs (miRs) sind seit einigen Jahren Gegenstand vieler Studien, welche Hoffnung säen, in den kleinen nicht-kodierenden Nukleinsäuren neue Biomarker gefunden zu haben. Diese sollen in der Diagnostik als Verlaufs- und Prognoseparameter und darüber hinaus sogar als mögliche Targets neuer Therapieansätze genutzt werden können. Viele Studien untersuchten lediglich ausgewählte miRs in Bezug zu verschiedensten Tumorleiden, aber auch zu anderen Krankheiten - häufig mit inkonsistenten Ergebnissen. Als eines der ursächlichen Probleme gilt die bislang fehlende Kenntnis über die physiologische Funktion der miRs, wie auch deren potenziellen Einflussfaktoren beim Gesunden. Darum widmete sich unsere Untersuchung speziell dem physiologischen Verhalten von miRs im Tagesverlauf. Wir rekrutierten vier gesunde, junge, sportliche Männer zur Studie des physiologischen Verhaltens von miRs im peripheren Blut. Die miRs wurden nach mehreren präanalytischen Schritten mittels eines qPCR-basierten Arrays analysiert. Insgesamt wurden 1066 miRs untersucht. Der Fokus wurde auf miRs mit hohem Expressionsniveau gelegt ($Ct < 30$ ($Ct = \text{cycle threshold}$, Maß für Menge an miRs)). Im Einzelnen waren miR-320, miR-24-3p und miR-1280 über den Tag gleichmäßig hoch exprimiert. Einzelne miRs zeigten tageszeitliche Unterschiede. So zeigte miR-365-3p eine Expressionssteigerung um das beinahe 2-Fache im Tagesverlauf, wohingegen miR-637 ein Expressionsmaximum und miR-1207 ein Expressionsminimum am Mittag zeigten. Bei miR-365-3p ist eine circadiane Rhythmik denkbar, wohingegen bei miR-637 und miR-1207 die vorausgegangene Nahrungsaufnahme eine entscheidende Rolle spielen könnte. Wenngleich es sich bei unserer Stichprobe um eine qualitative Untersuchung handelte, konnte gezeigt werden, dass bei gesunden Probanden nicht alle, jedoch einige miRs im peripheren Blut zuverlässig messbar waren. Zudem haben wir festgestellt, dass einzelne miRs, nicht aber das miRNom als Ganzes, einer zirkadianen Rhythmik folgen können und/oder durch Nahrungsaufnahme beeinflusst werden können. Unsere Untersuchung sollte daher durch Forschung an größeren Stichproben erhärtet werden, um einen Vergleich zu Untersuchungen bei Patienten zu ermöglichen.

1.2 Circadian rhythm of circulating miRs in healthy volunteers

miRs are a major research focus for the past several years, especially in the quest to identify novel biomarkers for diagnosis and progression of various diseases and maybe as therapeutic targets. Attempts to generate miR profiles from either tissues/cells or serum/plasma that are indicative for certain diseases have yielded inconsistent results. One problem consists in the limited understanding of the presence of certain miRs for instance in blood and their functional consequences. In addition, many physiological factors such as age, gender, nutrition state and others have been shown to influence the presence of miRs in a given clinical setting that are often not taken in consideration. Therefore, the aim of the present study was to generate a physiological profile of circulating miRs in the blood of healthy subjects over the course of the day. We recruited four healthy, young, normal-weight, male adults to profile serum miRs during the day. miRs were analyzed using qPCR-based whole miRNome arrays after several pre-analytic steps. A total of 1066 miRs were tested for their presence in serum. We turned attention to those miRs which were abundantly expressed in blood. Those highly expressed miRs did not reveal a consistent circadian rhythm or pattern. Several miRs (miR-320, miR-24-3p und miR-1280) had no specific fluctuation during the day but were consistently detectable. Among the miRs with variable expression levels, miR-365-3p demonstrated an expression increase during the day (average fold change 1.96) suggesting a seeming circadian rhythm. miR-637 displayed an expression maximum and miR-1207 a minimum at noon time. This may be owed to food intake. The low number of subjects in our study did only allow us to observe qualitative changes which is a limitation. In conclusion, we found miRs with and without fluctuation, but the whole miRnome has no specific pattern. Moreover fluctuation may due to foodintake/starvation. So, studies with larger cohorts on the circadian behavior of circulating miRs should be conducted to shed light on the physiological function of circulating miRs in peripheral blood and to enable comparison to our study.

2 Einleitung

2.1 Was sind miRs?

miRs sind einsträngige, 22 nt lange, nicht-kodierende RNA-Moleküle. Bis heute sind >1800 Sequenzen bekannt (1881 Sequenzen, Tendenz steigend [92]). miRs gehören zu der Gruppe der small RNAs und spielen eine zentrale Rolle in der Regulierung der Genexpression. Es wird geschätzt, dass ca. 60% aller Protein-kodierenden Gene Targets von miRs sind [22]. Man geht davon aus, dass eine miR alleine mehrere hundert Target-Gene und dass wiederum ein einzelnes Gen auch von mehreren verschiedenen miRs reguliert werden kann[54]. Dies verdeutlicht die Komplexität des miRs-Netzwerks.

Die Biogenese der (humanen) miR (Abbildung 1) beginnt mit der Transkription der miR-Gene durch die RNA-Polymerase II (in seltenen Fällen auch durch die RNA-Polymerase III) im Nukleus [54]. Durch die Transkription entsteht die primäre miR (pri-miR). Sie ist etwa 1kb lang und formt eine zentrale Haarnadelschleife, die die Sequenz der mature miR beinhaltet [26]. Die RNase Drosha initiiert den Reifungsprozess und trennt einen unteren Teil des Stammes ab. Drosha und das RNA-Bindungsprotein DGCR8 (diGeorge syndrom critical region 8), bilden zusammen den Microprozessor und sind für das Schneiden und die damit zusammenhängende Spezifität der pri-miR zuständig. Die dadurch entstandene pre-miR (precursor-miR) hat dann noch eine Länge von rund 60-70 Nukleotiden. Anschließend wird die pre-miR in das Zytoplasma transportiert. Dies geschieht durch die Bildung eines Transportkomplexes aus EXP5 (Exportin5), RAN-GTP und der pre-miR [5]. EXP5 scheint neben seiner Transportfunktion auch den Abbau der pre-miR im Nukleus zu verhindern [26]. Im Zytoplasma wird der Stamm der pre-miR von der Schleife durch die Endonuklease Dicer abgetrennt und es entsteht eine kleine doppelsträngige RNA (miR-Duplex). Diese besteht aus einem guide-Strang (miR) und einem passenger-Strang (miR*). Der guide-Strang ist in der Regel derjenige der beiden Stränge, der letztendlich die Funktion zusammen mit dem RISC (RNA induced silencing complex) ausübt, während der passenger-Strang entlassen und abgebaut wird. Für die Wahl, welche Stranghälfte als „passenger“ und welche als „guide“ genutzt wird, ist unter anderem die thermodynamische Stabilität der Duplex-miR sowie die Bioaktivität verantwortlich [67, 85]. Die Endonuklease Dicer mit ihren Co-Proteinen, TRBP (transactivation-response RNA-Binding protein) und PACT (protein kinasae R-activating protein), wirken bei der Wahl des Guide-Stranges mit [85]. Der nächste Schritt ist die Bildung und Formation des sogenannten RISC (RNA-induced silencing complex). Diese

verläuft in zwei Schritten. Zuerst wird die doppelsträngige RNA unter ATP-Verbrauch und Zuhilfenahme von Dicer sowie seinen Co-Faktoren unselektiv an ein AGO-Protein (Argonaute-Proteine) gebunden und formen so gemeinsam den pre-RISC [26]. Argonaute-Proteine gehören zu der PIWI-Protein-Superfamilie (PIWI=P element-induced wimpy testis), welche die Prozesse der RNA-Interferenz (RNAi) kontrollieren und steuern [70]. In Säugetieren existieren insgesamt vier verschiedene AGO-Proteine (AGO1-4). Darunter besitzt allein AGO2 eine Endonuklease-Funktion [70]. Als nächstes wird der passenger-Strang entfernt. Dieser kann bei guter Kompatibilität der miR-Duplex direkt durch die Endonuklease C3PO abgebaut werden. Bei geringerer Kompatibilität der miR-Duplex kommt es durch Helikasen zu Entwindung des Doppelstrangs mit anschließender Freisetzung des passenger-Strang aus dem RISC in das Zytoplasma und zu dortiger Degradation durch Endonukleasen [21]. Der guide-Strang verbleibt im AGO-Protein und bildet mit weiteren Co-Faktoren den mature-RISC-Komplex. Zur endgültigen Funktionsausübung muss der guide-Strang zusammen mit dem RISC zur Target-miR geführt und daran gekoppelt werden [79]. Die miR-Bindungsstelle auf Seiten der mRNA ist üblicherweise an der 3'UTR (untranslated region) lokalisiert. Die Bindungsstelle am 5' Ende der miR, wird „seed“ genannt, erstreckt sich über die Nukleotid-Positionen 2-7 und ist für die Target-Erkennung zuständig [27]. Über die Art der Genregulation entscheidet dann wieder die Komplementarität der Seed-Region der miR als auch die Übereinstimmung der Basen an den zentralen Nukleotide 9-11. Bei hoher Übereinstimmung zwischen miR und mRNA wird die mRNA durch AGO2 in zwei Fragmente geschnitten und dann durch RNA-Hydrolyse abgebaut [48]. Bilden miR und mRNA ein Mismatch kommt es zu Translationsunterdrückung, Deadenylierung und Decapping unter Zuhilfenahme eines Protein-Komplexes, bestehend unter anderem aus GW182 und AGO [19, 79].

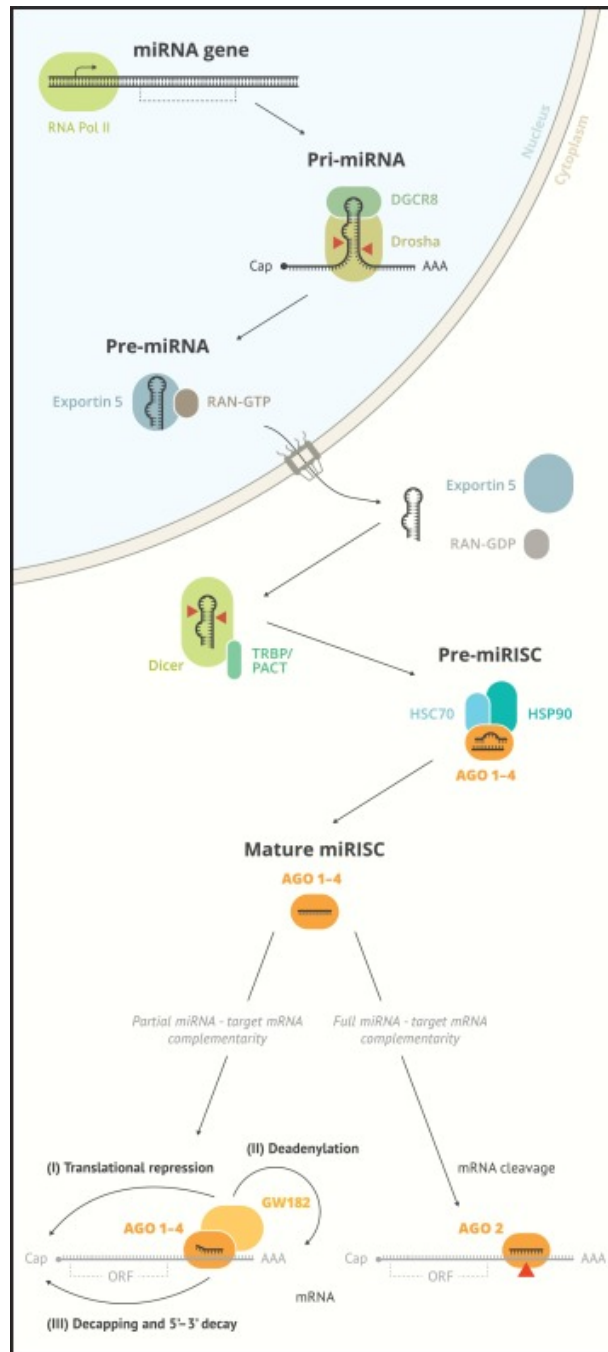


Abbildung 1: Biogenese der miRs nach [41]: Entstehung der pri-miR durch die RNA-Polymerase II. Die pre-miR wird durch den Drosha/DGCR8-Mikroprozessor-Komplex aus der pri-miR ausgeschnitten. Ein Komplex aus Exportin5 und RAN-GPT transportiert die pre-miR ins Zytoplasma. Dort wird sie durch einen Komplex aus Dicer, TRBP und PACT erneut geschnitten. Es entsteht eine doppelsträngige RNA. Diese wird an ein AGO gebunden und bildet den miRISC. Bei vollständiger Komplementarität von miR und mRNA-Target sowie Assoziation mit AGO2 wird die mRNA durch AGO2 geschnitten und durch Endonukleasen abgebaut. Bei unvollständiger Übereinstimmung kommt es durch einen direkten Bindungspartner der AGO-Proteine (GW182) zur Translationsunterdrückung, Deadenylierung, Decapping und dem Abbau der mRNA. Bild und Text nach [41].

Neben der eben beschriebenen „klassischen“ Biogenese scheinen auch alternative Entstehungswege zu existieren. Zum einen Prozesse, die ohne Beteiligung des Microprozessors oder Dicer-unabhängig funktionieren. Oder beispielsweise während der Mirtronproduktion, bei der der Drosha-Prozess durch Splicing ersetzt wird. In diesem Fall

scheint AGO2 den guide-Strang zu schneiden. Diese nicht-kanonischen Signalwege spielen aber nur für einen sehr kleinen Anteil (rund 1%) der miRs eine Rolle und ihre Relevanz ist somit mit Vorsicht zu betrachten [5, 26, 27].

2.2 Vorkommen

miRs können sowohl intrazellulär als auch extrazellulär nachgewiesen werden. Sie sind in vielen Körperflüssigkeiten, unter anderem im Serum, Plasma, Urin, Speichel, Tränenflüssigkeit und Liquor messbar [83]. Insgesamt liegen jedoch mehr miRs intrazellulär als extrazellulär vor [67]. Intrazellulär üben sie über die Interaktion mit mRNAs eine Form der Genregulierung aus. Es scheint jedoch auch miRs zu geben, welche frei in der Zelle und nicht an RISC gebunden sind und deren Funktion bislang jedoch noch ungeklärt ist [27]. Über die Herkunft der extrazellulären miRs gibt es verschiedene Theorien. Die eine beschreibt eine gezielte Freisetzung (bspw. Sekretion) durch andere Zellen. Die andere erklärt die freien miRs als Überreste nach physiologischem oder pathologischem Zelltod [28]. Für erstgenannte Theorie gibt es zahlreiche Hinweise [12]:

Nachweislich sind extrazelluläre miRs mit verschiedenen Carriern assoziiert [10]. Zu diesen zählen: Exosomen, Mikropartikeln/Mikrovesikeln (MP/MV), Lipoproteine (LP) und Proteine wie AGO2 [3, 10, 34, 73–75]. Mitchell et al. berichteten 2008 erstmals über die Stabilität von miRs in Plasma und Serum [47]. Die Stabilität im Serum/Plasma zeichnet sich dadurch aus, dass die miRs nicht durch RNasen abgebaut werden und dass die Temperatur, der pH-Wert, Gefrier- und Tauvorgänge oder die Lagerung allenfalls geringen Einfluss auf die Expressionslevel der miRs im Plasma oder Serum haben [11, 47]. Diese Stabilität wird grundsätzlich auf die Bindung mit den verschiedenen Trägern zurückgeführt [3, 28, 75, 82]. Durch diese werden die miRs vor dem Abbau durch RNasen geschützt [90]. Die Stabilität ist jedoch nicht für alle miRs gleich [34, 39]. Argoprotein 2 (AGO2) scheint einige miRs zusätzlich (über den Schutz der MV hinaus) und zudem effektiver in der Zirkulation vor dem Abbau durch RNase zu schützen [3, 73]. Darüber hinaus scheint auch der Assoziationsgrad mit AGO Einfluss auf die Stabilität zu haben [39]. Ebenso wird ein besonderer Schutz durch Nucleophosmin1 (NPM1) berichtet, das an der ribosomalen Entwicklung im Nucleus beteiligt ist [67, 82, 90].

2.3 miRs und Biomarker

Durch den Nachweis der miRs im Blut, sowie der Erkenntnis der oben (Kapitel 2.2) beschriebenen Stabilität, scheinen miRs das Potenzial für diagnostische Parameter (Biomarker) zu besitzen [29, 69, 84].

Die Entdeckung von Lawrie et al. im Jahr 2008, in der anhand von miR im Serum Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom von gesunden Personen unterschieden werden konnten [37], unterstützte erstmals die Vorstellung, mit den kleinen nicht- kodierenden miRs eine neue Form der Biomarker entdeckt zu haben. Seit dem gibt es zahlreiche Untersuchungen, die sich mit miRs als Biomarker für verschiedene Karzinome [42, 53, 88], aber auch für andere Erkrankungen, wie beispielsweise den Myokardinfarkt [80], beschäftigen. Verschiedene Argumente sprechen für miRs als Biomarker: unter Anderem, dass sie „non-invasiv“ (durch eine venöse Blutentnahme) gewonnen werden können und ihre eben beschriebene Stabilität im Serum [29, 84]. Zudem gibt es, mit Blick auf die bisher veröffentlichte Literatur, einige Anhaltspunkte, dass die miRs auch durch Krankheitsprozesse verändert werden können [12, 84].

2.4 miRs und die interzelluläre Kommunikation

Die Anwesenheit von miRs im Extrazellulärraum lässt vermuten, dass die miRs eine Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation spielen können [41]. Sowohl über den Eintritt in die Blutbahn als auch die Wiederaufnahme in eine neue Zelle gibt es verschiedene Theorien (Abbildung 2). Für den Mechanismus, durch den die miRs in die Zirkulation gelangen, existieren verschiedene Theorien [12]. Es werden sowohl ein passives Ausströmen im Rahmen von Nekrose, Apoptose oder Inflammation [67], aber auch eine aktive Sekretion via Membranvesikel wie Exosomen und Mikrovesikel [90] oder durch Komplexbildung mit Lipoproteinen [75] und RNA-Bindungsproteinen wie AGO2 [3, 39, 73] oder NPM1 [82] berichtet.

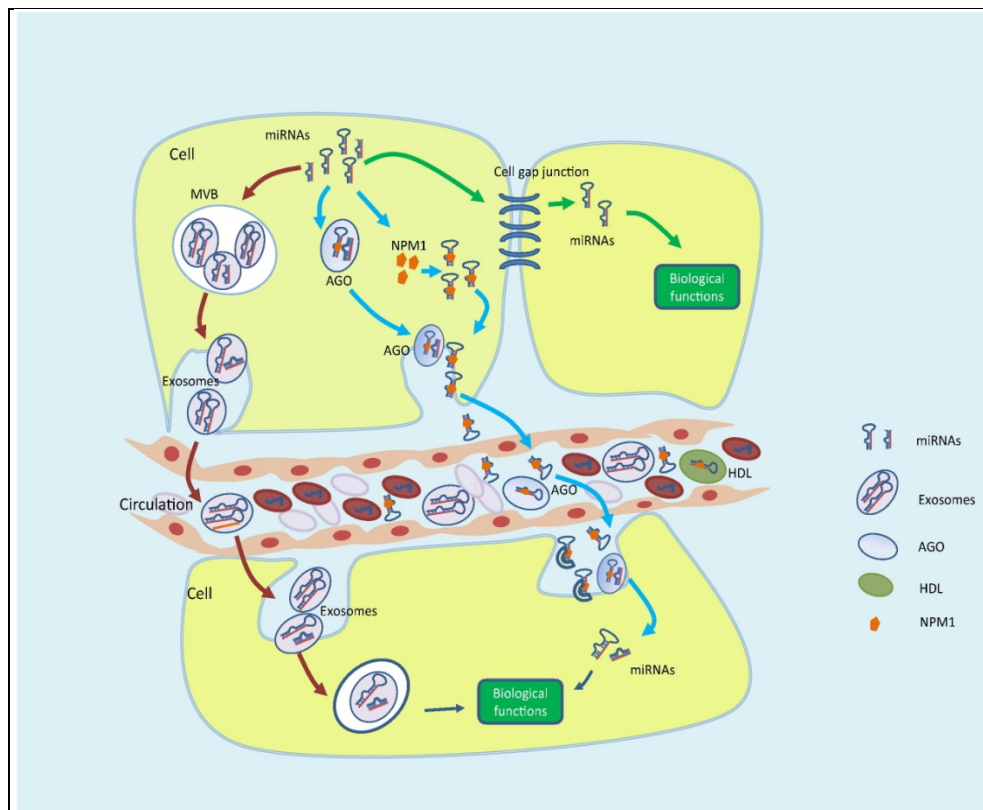


Abbildung 2: Möglichkeiten der interzellulären Kommunikation von miRs. Für die Zell-Zell-Kommunikation sind verschiedene Wege denkbar. Entweder über extrazelluläre Vesikel, Exosomen oder Mikrovesikel (rote Pfeile), durch RNA-Bindungsproteine, bspw. AGO oder NPM1 (blaue Pfeile) oder direkter Transfer zwischen den Zellen über Gap Junctions (grüne Pfeile). Bild und Text nach [12].

Die genauen Abläufe diesbezüglich sind bisher nicht vollständig geklärt [28, 41]. Es gibt jedoch Hinweise, dass insbesondere beim Export von miR in Assoziation mit Exosomen und HDL die neutrale Sphingomyelinase 2 (nSMase2), sowie der Ceramid-Pathway eine wichtige Rolle spielen [75]. In der Zell-Zell-Kommunikation der miR scheinen insbesondere die Exosomen eine funktionale Rolle im Transport einzunehmen [74, 90]. Wohingegen die Rolle der miR, die an AGO2 gebunden sind, kontrovers diskutiert wird [10, 39]. So stellen Boon and Vickers grundsätzlich die Funktionalität von rein AGO-gebundenen miR in Frage [10]. Im Gegensatz dazu thematisiert Li et al, dass möglicherweise einzig diese miRs mit AGO-Bindung eine Funktion aufgrund ihrer größeren Stabilität haben könnten [39]. Für die Nicht-vesikulären miRs, die an AGO2 gebunden sind, wird vermutet, dass diese möglicherweise lediglich passiv aus den Zellen nach Nekrose oder Apoptose austreten. Ein selektiver Prozess für AGO2-miRs kann dennoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden [41, 73]. Zudem gibt es eine wachsende Evidenz, dass miRs selektiv, möglicherweise auf spezifische Signale hin, verpackt und aus der Zelle transportiert werden [10]. Hingegen ist der Mechanismus der miR-Sortierung in Mikrovesikeln weiterhin ungeklärt [41].

Auch für die Aufnahme in die Zielzelle gibt es verschiedene Hypothesen [12, 67], beispielsweise durch Endo-/Phagozytose von Vesikeln oder durch Oberflächenrezeptoren. Fabbri et al. haben beispielsweise gezeigt, dass miR-21 und miR-29a in Exosomen sezerniert werden, dann selbst als Liganden an Toll-Like-Rezeptoren (TLR8) auf murinen und humanen Immunzellen binden können und dadurch eine Signalkaskade auslösen, die zu Zytokinausschüttung führt [20]. Abgesehen von der Zellkommunikation via Blutbahn wird darüber hinaus ein interzellulärer Austausch durch gap junctions debattiert [12]. Endgültig in der Zielzelle angekommen, geht man bislang davon aus, dass die importierten miRs ihre Funktion genauso ausüben, wie die direkt in der Zelle produzierten miRs [14, 67].

2.5 miRs und der zirkadiane Rhythmus

In nahezu allen lebenden Organismen existieren tageszeitliche Veränderungen in physiologischen Vorgängen, vom Verhalten bis hin zur zellulären und molekularen Ebene [81]. Diese Veränderungen unterliegen der sogenannten zirkadianen Uhr. Sie reguliert und steuert eine Vielzahl von physiologischen Prozessen, wie beispielsweise den Schlaf-Wach-Rhythmus oder die Körpertemperatur. Sie hilft dem Organismus, sich bestimmten Umweltbedingungen, wie beispielsweise Hell und Dunkel anzupassen [18, 88]. Besonders wichtig bei Säugetieren ist in diesem Zusammenhang der Nucleus suprachiasmaticus, welcher im Hypothalamus liegt [81] und dem Gesamtorganismus übergeordnet ist. Neben diesem zentralen Regulator besitzt zusätzlich jede einzelne Zelle ihr eigenes zirkadianes Uhrwerk [88]. Auf molekularer Ebene besteht der zirkadiane Rhythmus aus einem Netzwerk aus Proteinen und Genen, die sich gegenseitig über negative Transkriptions-Translations-Feedback-Mechanismen regulieren [23, 81]. Hierzu zählen insbesondere die Cryptochrom- (Cry-) und Period- (Per-) Gene, sowie die Aktivator-Proteine BMAL1 und CLOCK. Da miRs schätzungsweise rund 60% unserer Gene regulieren [22], ist es naheliegend, dass sie auch hinsichtlich der Zirkadianik eine Rolle spielen. Die konkreten Mechanismen der Regulation des zirkadianen Uhrwerks werden intensiv erforscht. Zunehmend rücken die miRs auch als Regulatoren auf posttranskriptioneller Ebene in den Fokus [23]. Grundsätzlich sind zwei verschiedene Varianten im Zusammenspiel von miRs und der zirkadianen Uhr denkbar. Auf der einen Seite können miRs die Expression der zentralen Zirkadianproteine und -Gene (bspw. CLOCK oder BMAL1) modulieren. Zum anderen können miRs in ihrer Expression selbst der Regulation der zirkadianen Uhr unterliegen. Dass eine solche Unterscheidung schwierig ist und es komplexe „Mischformen“ gibt, zeigt die Untersuchung von Tan et al. So ist beispielsweise BMAL1 ein Target von miR-142-3p, diese wird wiederum durch CLOCK kontrolliert und wird rhythmisch oszillierend exprimiert [71]. Auch an anderer Stelle wird von

ausgeprägten Überschneidungen zwischen zirkadian exprimierten miRs und den Zirkadianik-regulierenden mirRs gesprochen [24, 46, 81].

2.6 Hypothese/ Fragestellung

miRs sind stabil im Blut nachweisbar (siehe Kapitel 2.2), sie sind Teil der Genregulation und scheinen zudem in Verbindung zur zirkadianen Rhythmik zu stehen (Kapitel 2.5). Hieraus ergab sich für uns die Frage, inwieweit auch das physiologische miRNome, oder auch nur einzelne miRs tageszeitlichen Expressionsschwankungen unterliegen, und wenn ja, welche physiologischen Einflussfaktoren hierfür denkbar sind. Ziel der Untersuchung war es, ein physiologisches Tagesprofil von zirkulierenden miRs zu erstellen.

3 Material und Methoden

3.1 Studien-Design

Hierzu wurden Serumproben an der Uniklinik in Homburg von jungen, gesunden Männern (Studenten) zu drei verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Die Blutentnahmen waren durch das Ethikkomitee der Saarländischen Ärztekammer (Votum 78/12) genehmigt worden. Es wurden schriftliche Einverständniserklärungen der freiwilligen Probanden eingeholt. Die Serumproben wurden dann mit „whole miRNome qPCR arrays“ der Firma Qiagen (Qiagen, miRBase v.16 mit 1066 miRs) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Stefanie Kreis an der Universität Luxemburg durchgeführt und analysiert. Anschließend wurden die Werte der einzelnen Zeitpunkte mit Hilfe eines web-basierten Software-Paketes (früher von sabiosciences, aktuell über die Website von Qiagen, siehe auch Kapitel 3.9) für das miR PCR array System ausgewertet und miteinander verglichen.

3.2 Probandenkollektiv

Um möglichst einheitliche Ergebnisse zu erzielen, rekrutierten wir 4 gesunde Probanden. Diese vier Probanden (im Folgenden als Vol1 bis Vol4 bezeichnet) erfüllten folgende Bedingungen:

- Einheitliches Geschlecht: Ausschließlich Männer
- Ähnliche Altersklasse: Geburtsjahrgang 1987-1989
- Keine bekannten Vorerkrankungen
- BMI im Normalbereich
- Keine regelmäßige Medikamenteneinnahme
- Nichtraucher
- Durchschnittlich 2-3x pro Woche sportliche Aktivität

Detaillierte Basisinformationen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Probandeneigenschaften

Proband	01 (Vol1)	02 (Vol2)	03 (Vol3)	04 (Vol4)
Geschlecht	männlich	männlich	männlich	männlich
Alter	26	26	25	27
Körpergewicht	70kg	94kg	82kg	70kg
Körpergröße	180cm	190cm	194cm	180cm
Body-Mass-Index	21,6	26	22	21,6
Nichtraucher	ja	ja	ja	ja
Regelmäßige Medikamente	nein	nein	nein	nein

Zum allgemeinen Screening der Gesundheit der Probanden wurde am Morgen eine zusätzliche Blutentnahme (nüchtern) zur Analyse von Routineparametern abgenommen. Diese wurden im Zentrallabor der Universitätsklinik Homburg ausgewertet. Diese Laborroutine setzte sich wie folgt zusammen: großes Blutbild (inklusive Differentialblutbild), Kortisol, TSH, Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium und Chlorid), Phosphat, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Glucose, CK, GOT, GPT, gammaGT, Cholesterin, Triazylglyzeride, HDL, Bilirubin gesamt, Eiweiß, Albumin, Pankreas-Amylase, Lipase, LDH, Magnesium, Eisen, CRP. Diese Routinelaboruntersuchung war bei allen Probanden unauffällig (siehe Kapitel 10.3).

3.3 Materialgewinnung

Die Serumproben für die vorliegende zirkadiane miRNome-Analyse wurden von den vier Probanden (Vol1-Vol4) zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Die Zeitpunkte der Blutentnahmen waren jeweils auf 08.00 Uhr, um 12.45 Uhr und um 17.15 Uhr festgelegt worden. Am Morgen (08.00 Uhr) kamen die Probanden nüchtern. Der Blutentnahme um 12.45 Uhr ging direkt ein Standardmittagessen voraus. Die Letzte Probenentnahme erfolgte dann wieder ohne direkt vorangegangene Nahrungsaufnahme (Nahrungskarenz ca 4-5h). Um die Reproduzierbarkeit der Daten zu überprüfen, sowie zur Homogenisierung der Daten, wurden zwei der vier Probanden (Vol2 und Vol4) genau eine Woche später zur Wiederholung des Versuchsaufbaus rekrutiert (Vol2/2 und Vol4/2). In dieser Woche zwischen den zwei Entnahmen folgten die Probanden ihrem gewohnten Alltag (Schlafrythmus, Mahlzeiten, Sport).

Neben der Serum-Monovette für die eigentliche miR-Untersuchung (die jeweils zu allen drei Zeitpunkten abgenommen wurde), wurde am Morgen zusätzlich Blut für die Routinelaborparameter (siehe oben) abgenommen. Hier wurden jeweils eine EDTA-Monovette, eine Lithium-Heparin-Monovette und eine Serum-Monovette benötigt.

Die weitere Verarbeitung der Serumproben erfolgte nach einem standardisierten Prozedere, welches von Margue et al zur Minimierung der Prozessierungs-Variabilität entwickelt wurden [43]: Demnach wurde die Serummonovette direkt nach der Blutentnahme zuerst für 45 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss wurde sie für 15 Minuten mit 2000 rpm (no break) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Aus dem zellfreien Überstand (Serum) wurden dann 2 Teilportionen à 500µl (aliquots) in Eppendorf-Sammelgefäße pipettiert. Um miRs aus zerstörten Zellen nicht zu messen, galt der Untersuchung des zellfreien Serums besondere Vorsicht. Die fertig-portionierten Proben wurden dann erneut für ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur ruhen gelassen, um eine Sedimentation eventuell doch transferierter Zellteile zu ermöglichen. Zuletzt wurden die aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur RNA-Extraktion erfolgte bei -80°C.

3.4 Qualitätskontrollen

Die fehlende Vergleichbarkeit von Studien aufgrund unterschiedlicher Protokolle wurde bereits durch eine Vielzahl von Publikationen kritisiert [12, 31, 67] (siehe Kapitel 5.4). Aus dieser Problematik heraus haben Margue et al. eine Kombination aus verschiedenen Qualitätskontrollen zusammengestellt, um die Qualität und Reproduzierbarkeit zu verbessern [43]; diese Qualitätskontrollen wurden für die vorliegende Arbeit übernommen: Als erstes Qualitätsmerkmal wurde ein standardisiertes Protokoll für die Materialgewinnung entwickelt und für alle Analysen verwendet (siehe Kapitel 3.3). Darüber hinaus wurde ein standardisiertes Protokoll für die Serumextraktion zu Grunde gelegt (siehe Kapitel 3.5). Als weitere Qualitätskontrolle fungierten die Spike-in-Kontrollen dreier exogener miRs. Diese sind von außen in bekannter Konzentration hinzugefügte miRs, die ebenfalls gemessen wurden und somit als Extraktionskontrolle und zur Quantifizierung dienten. Hierzu wurden miRs aus *C. elegans* verwendet: cel-39, cel-54, cel-238 [36]. Zusätzlich wurde cel-39 auch analysiert. Diese cel-39-Expressionslevel wurden genutzt, um die Daten aller Samples zu kalibrieren. Eine weitere Qualitätskontrolle bestand darin, die RT-qPCR durch eine qPCR verschiedener Primer (cel-39, cel-54, cel-238, miR-451a, miR-23a-5p, SNORD61, SNORD68, SNORD72, SNORD95, SNORD96A und RNU6-2) zu überprüfen. Die nächste Ebene der Qualitätskontrolle war die Überprüfung der RNA-Extraktion nach preamplification. Dies erfolgte mittels miRTC (internale reverse transcription control) und PPC (positive PCR control). Beide Kontrollen werden genutzt, um Inhibitoren der reversen Transkription und der RT-PCR zu ermitteln. Nur bei korrekten Werten beider Kontrollen wurde die Platte mit allen zu analysierenden miRs (plate) für die weitere Analyse verwendet. Als letzte Qualitätsinstanz fungierte die standardisierte Normalisierung: Bei aktuell noch fehlender etablierter

standardisierter Referenz-miRs, wurde eine eigene Normalisierungs-Methode entwickelt: Diese basierte auf Durchschnittswerten der „commonly expressed miRs“, also denjenigen miRs, die in allen samples detektiert werden konnten („global mean methode“).

3.5 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mit dem „miRNeasy Serum/Plasma kit“ von Qiagen [57] nach modifiziertem Originalprotokoll durchgeführt:

Als erstes wurde die gefrorene 500µl Teilportion bei Raumtemperatur aufgetaut und es wurden nochmals 2x200µl Einzelportionen in Eppendorff-Gefäße separiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (13000rpm für 30min bei 4°C). Die Duplikatur wurde vorgenommen, da - laut Hersteller - für die RNA-Extraktion maximal 200µl verwendet werden sollen, aber diese Menge für die spätere Quantifizierung aufgrund der geringen RNA-Konzentration nicht ausreichend ist. Am Ende der Extraktion wurden die beiden Eluate wieder zusammengeführt und als eine Probe weiterverwendet. Zu den 200µl Serum wurden 1000µl Qiazol Lyse-Reagenz hinzugefügt, anschließend vermischt und für 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Als Nachweis für eine erfolgreiche Extraktion (und zur späteren Kalibrierung) wurden 3,5µl miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Kontrollen, bestehend aus cel-238, cel-39, cel-54, (10:1:0,1) dazugegeben und gemischt. Diese sind von außen in bekannter Konzentration hinzugefügte miRs, die ebenfalls gemessen wurden und somit als Extraktionskontrolle und zur Quantifizierung dienen.

Als nächstes wurde 200µl Chloroform dazugegeben und für 15sek gut durchgeschüttelt, so dass sich eine vollständige Phasentrennung einstellen konnte. Wieder ruhten die Proben für 2-3min bei Raumtemperatur (15-25 °C), um dann mit 12000g bei 4°C für 15min erneut zentrifugiert zu werden. Nach dieser Zentrifugation trennten sich die Proben in drei sichtbare Phasen: eine RNA-enhaltende oberste farblose, eine weißliche Interphase und eine unterste rötliche Phase. Die oberste Phase (600µl) mit der darin enthaltenen RNA wurde wieder abpipettiert und in ein neues Eppendorffgefäß transferiert. Hierbei musste besonders darauf geachtet werden, dass keinerlei Material aus der Interphase mit transferiert wurde. Zusätzlich wurde 900µl 100% Ethanol dazugegeben (fertiges Gesamtvolumen: 1500µl) und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Direkt im Anschluss wurden 750µl der Probe in ein spezielles Sammelgefäß (2ml) mit einer darin enthaltenen „miRNeasy MinElute spin column“ gegeben und bei fest verschlossenem Deckel mit 10000rpm für 15sek bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Schritt wurde mit den restlichen 750µl wiederholt. Als nächstes wurde das miRNeasy MinElute spin column mit

700µl RWT Puffer gespült, der Deckel wieder verschlossen und bei 10000rpm für 15sek zentrifugiert. Der Durchfluss im Sammelgefäß wurde erneut verworfen. Dieser Schritt wurde mit 500µl RPE Puffer wiederholt. Die beiden zuletzt genannten Schritte dienen der Elimination von Salzen und Phenol aus der spin column, so dass nur reine RNA in der Membran verblieb. Zur weiteren Waschung wurden im nächsten Schritt 500µl 80% Ethanol wieder auf die spin column pipettiert, der Deckel verschlossen, bei 10000rpm für 2min zentrifugiert und anschließend der Durchfluss inklusive des Sammelgefäßes verworfen. Beim Verwerfen des Durchflusses musste eine Kontamination vermieden werden. Die gut gespülte spin column wurde in einem neuen 2ml Sammelgefäß platziert und anschließend mit 13000rpm für 5min bei offenem Deckel erneut zentrifugiert. Dieser Schritt diente der Trocknung der in der spin column enthaltenen Membran, sodass Ethanolrückstände, die weitere Schritte hätten verfälschen können, eliminiert wurden. Das Sammelgefäß wurde inklusive des Durchflusses wieder verworfen. Als letzter Schritt der RNA-Extraktion wurde die spin column in ein neues 1,5ml Sammelgefäß gesetzt und dann 14µl RNase-freies Wasser direkt auf das Zentrum der spin column gegeben. Bei verschlossenem Deckel erfolgte eine weitere Zentrifugation mit 13000rpm für 1min um die RNA aus der Membran zu lösen. Da das Totvolumen der spin column ca 2µl beträgt, besaß am Ende das reine Eluat mit der darin enthaltenen RNA ein Volumen von 12µl. (vgl. [57]). Auf diese Weise sind pro 200µl Teilportion 12µl Eluat entstanden. Insgesamt entstand so pro Serumprobe 2x12µl Eluat (nach Herstellerprotokoll, [57]).

Anschließend wurde eine Qualitätskontrolle mittels RT-qPCR für folgende Primer durchgeführt [57]:

- Cel-39, cel-54, cel-238 Spike-in, um die Extraktionsqualität zu prüfen.
- miR-451a (Indikator für Blutzellen [33, 34] und miR23a-5p (als Hämolyse-Indikator [7]).
- SNORD61, SNORD68, SNORD72, SNORD95, SNORD96A und RNU6-2 sind in Blutzellen, aber nicht in Serum vorhanden. Sie dienen als Indikator für Kontamination des Serums mit Blutzellen [63] (Siehe Kapitel 10.2).

3.6 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der zuvor extrahierten RNA erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des „miScript II RT Kit“ [56]. Hierbei wird die zuvor gewonnene RNA zuerst polyadenyliert und dann mit einem oligo-dT Primer in cDNA umgeschrieben.

Als erstes wurde ein insgesamt 10µl umfassender Mix für die reverse Transkription angesetzt. Von den zwei zur Verfügung stehenden Pufferlösungen („miScript *HiSpec* Puffer“ und „miScript *HiFlex* Puffer“) wurde für die mature-miR-Analyse der „miScript *HiSpec* Puffer“ zu verwendet, da dieser für den „miScript miRNA PCR Array“ vorgesehen ist.

Der 10µl umfassende Reaktionsansatz umfasste 2µl des „HiSpec Puffer“, 1µl „Nucleics Mix“, 1µl „Reverse Transkriptase Mix“, 2µl RNase-freies Wasser sowie 4µl RNA-Eluat aus der vorigen Extraktion. Dies wurde vermischt, zentrifugiert und auf Eis gelagert. Als nächstes wurden die Proben zu erst für 60 min bei 37°C und anschließend - zur Inaktivierung des reversen Transkriptase Mix - nochmals für 5min bei 95°C inkubiert. Als letzter Schritt vor der Preamplifikation wurde nun die entstandene cDNA mit 40µl RNase-freiem Wasser verdünnt (Verdünnung 1:5) [58].

3.7 Preamplifikation

Aufgrund der erwarteten geringen Menge von miRNA im Serum wurde vor der real-time PCR eine Vervielfältigungsreaktion (Preamplifikation) der zuvor entstandenen cDNA angesetzt.

Für diese Reaktion wurde das „miScript preAMP Handbook August2012“, von Qiagen verwendet [58] und die Schritte entsprechend dem Herstellerprotokolls befolgt: Zuerst wurde die Basis-Reaktionslösung angesetzt. Diese bestand aus dem „PreAMP-Puffer“ (5µl), „HotStarTaq DNA Polymerase“ (2µl), „PreAMP Primer Mix“ (5µl), RNase-freiem Wasser (7µl) und dem „PreAMP Universal Primer“ (1µl). Diesem Mix wurden dann exakt 5µl verdünnte cDNA hinzugefügt (Gesamtvolumen 25µl), vorsichtig gemischt und zentrifugiert. Dieser Reaktionsansatz wurde für eine Serumprobe dreifach ausgeführt, da für die whole MiRNome-Analyse ein sample aus drei 384-well-Platten besteht. Anschließend wurde die Preamplifikation im Thermocycler mit folgenden Bedingungen (Tabelle 2) angesetzt und durchgeführt:

Tabelle 2: Zyklusbedingungen für 384-plex preamplification (aus „miScript preAMP Handbook August2012“, von Qiagen [58])

Schritt	Dauer	Temperatur
PCR-Aktivierungsstufe	15min	95°C
HotStarTaq DNA-Polymerase wird aktiviert.		
3-phasiger Zyklus		
Denaturierung	30s	94°C
Anlagerung	60s	55°C
Synthese/Verlängerung	60s	70°C
<i>Anzahl der Zyklen</i>	2	
2-phasiger-Zyklus		
Denaturierung	30s	94°C
Anlagerung/Synthese	3min	60°C
<i>Anzahl der Zyklen</i>	10	

Nach Abschluss der Reaktion wurde die vervielfältigte cDNA im Verhältnis 1:5 mit RNase freiem Wasser verdünnt (75µl cDNA: 300µl RNase-freies Wasser). Diese Verdünnung wurde wieder vorsichtig gemischt und dann auf Eis gelagert.

Anschließend wurden für die reverse Transkriptase sowie die Preamplifikation wieder Qualitätskontrollen durchgeführt. Hierfür wurden miR-16-5p, SNORD95, cel-39 und miRTC (interne reverse Transkriptase-Kontrolle) verwendet. Hierzu wurde eine real-time-PCR mit dem „SYBR Green PCR Kit“ und den Primern dieser Kontrollen ausgeführt. Der Kontroll-PCR-Mix bestand aus „QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix“ (5µl), „miScript Universal Primer“ (1µl), „miScript Primer Assay“ (1µl), sowie RNase freiem Wasser (1µl).

Vor Zugabe der verdünnten cDNA wurde diese nochmals verdünnt. Hierzu wurden 4µl der insgesamt 375µl verdünnter cDNA mit 92ml RNase-freiem Wasser vermischt. Anschließend wurden 2µl in die entsprechende Kontrollplatte gefüllt und dann der PCR-Mix (siehe oben) hinzugefügt, abgedeckt und dann für 1min bei 1000xg und Raumtemperatur zentrifugiert, um möglicherweise entstandene Blasen zu entfernen. Als nächstes wurde die real-time PCR mit den in Tabelle 3 beschriebenen Konditionen gestartet:

Tabelle 3: Zyklusbedingungen real-time PCR QC PreAMP („miScript preAMP Handbook August2012“, von Qiagen [58])

Schritt	Dauer	Temperatur
Aktivierungsstufe	15min	95°C
3-phasiger Zyklus		
Denaturierung	15s	94°C
Anlagerung	30s	55°C
Synthese/Verlängerung	30s	70°C
Anzahl der Zyklen	40	

Nach Beendigung der PCR konnten die Kontrolldaten analysiert werden. Zuerst wurde die Baseline und dann die „*threshold*“ definiert, anschließend die Ct –Werte abgelesen, um dann kontrolliert zu werden. Anhand der Ct-Werte der miR-16 konnte man die Verdünnung der cDNA überprüfen. Dieser Ct-Wert war >10 und bedurfte daher keiner weiteren Verdünnung. Der Ct-Wert (threshold cycle) fungiert als eine Art Maßeinheit, die die Menge an miR im Material einschätzen soll. (Abbildung 3, S.24)

3.8 Real-time PCR (qPCR)

Die real-time PCR (qPCR) ist der letzte Arbeitsschritt vor der Datenanalyse. Hierfür wurde das „miScript miRNA PCR Array Handbook Mai 2012“, von Qiagen [59] verwendet und nach Herstelleranleitung ausgeführt. Die real-time PCR wurde auf einem CFX384Detection System (BioRad) aufgeführt:

Zu Beginn wurden wieder die einzelnen benötigten Komponenten der PCR aufgetaut und dann anschließend der nötige „PCR Mix“ zusammengestellt. Für die miRNome-Analyse wurde das „384-well“- Format gewählt. Die hierzu vorgesehene Zusammensetzung bestand aus: „QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix“ (2050µl), „Universal Primer“ (410µl), RNase-freiem Wasser (1540µl) und der nach der Preamplifikation 1:5 verdünnten cDNA (100µl) (Mengenangaben für eine 384-well-Platte, daher pro Serumprobe 3 Ansätze nötig). Nachdem alles gut gemischt wurde, konnte der Reaktionsmix mit einer multichannel Pipette auf den „miScript miRNA PCR Array“ übertragen und vorsichtig mit „optical adhesive Film“ abgedeckt werden. Anschließend wurde der Array bei Raumtemperatur und 1000g für eine Minute zentrifugiert. Als nächstes wurde das cycling-programm eingestellt (Tabelle 4) und gestartet.

Tabelle 4: Zyklusbedingungen real-time PCR (aus „miScript miRNA PCR Array Handbook Mai 2012“, von Qiagen, [59])

Schritt	Dauer	Temperatur
Aktivierungsstufe	15min	95°C
HotStarTaq DNA-Polymerase wird aktiviert.		
3-phasiger Zyklus		
Denaturierung	15s	94°C
Anlagerung	30s	55°C
Synthese/Verlängerung	30s	70°C
<i>Anzahl der Zyklen</i>	<i>40</i>	

Nach Beendigung der qPCR konnte mit der Datenanalyse fortgefahren werden.

Die Qualitätskontrolle der qPCR erfolgte mittels der Analyse von Temperaturkurven. Sie dienen der Verifizierung der Spezifität der gemessenen miRs [59]. Hierzu war eigens eine Vektormaschinen-basierte Methode von Margue entwickelt worden [43]. Dieses Programm analysierte die Schmelzkurven und kategorisierte diese nach „gut“ und „schlecht“. miRs mit schlechten Schmelzkurven wurden nicht weiter in der Analyse mit einbezogen.

3.9 Datenanalyse

Grundsätzlich gilt anzumerken, dass die durch die RT-PCR generierten Daten zur Analyse als Fluoreszenzsignal gegen die benötigten PCR-Cyclen aufgetragen werden. Hieraus entstehen sigmoide Kurven (Abbildung 3). Zur weiteren Analyse sind zwei Begriffe von zentraler Bedeutung und müssen als erstes adjustiert werden. Dies sind die „Baseline“ und „Threshold“ [59].

Die „Baseline“ ist definiert als der Bereich, in dem noch keine Fluoreszenz von PCR-Produkten detektiert werden kann. Dieser Bereich muss manuell festgelegt werden. Die „Baseline“ befindet sich im Bereich zwischen dem zweiten Zyklus und zwei Zyklen vor dem ersten detektierbaren Signal. Dies musste für alle drei Platten eines Samples durchgeführt werden um anschließend einen Mittelwert für ein Sample ermitteln zu können [59].

Der „Threshold“ dient der schnellen Identifizierung des log-linearen Bereiches. Er sollte in Bereichen angelegt werden, in dem das Fluoreszenzsignal erstmals über dem Hintergrundsignal aber innerhalb der unteren Hälfte des log-linear-Bereichs liegt. „Threshold“ sollte niemals in einer Plateauphase gesetzt werden (Abbildung 3). Der Threshold-Zyklus (threshold cycle =Ct) dient als Hilfsmittel um die zu Beginn vorhandene Menge an Startmaterial einschätzen zu können [59]. Er gibt an, wie viele Zyklen eine miR durchlaufen

muss, um von der Fluoreszenzmikroskopie erkannt zu werden. Hierbei bedeutet eine geringe Anzahl von Zyklen, dass die miR schon nach kurzer Zeit erkannt wird und somit in größeren Menge vorliegt als eine miRNA, die in kleinerer Menge vorhanden ist und somit mehrere Zyklen braucht um detektiert werden zu können (Abbildung 3).

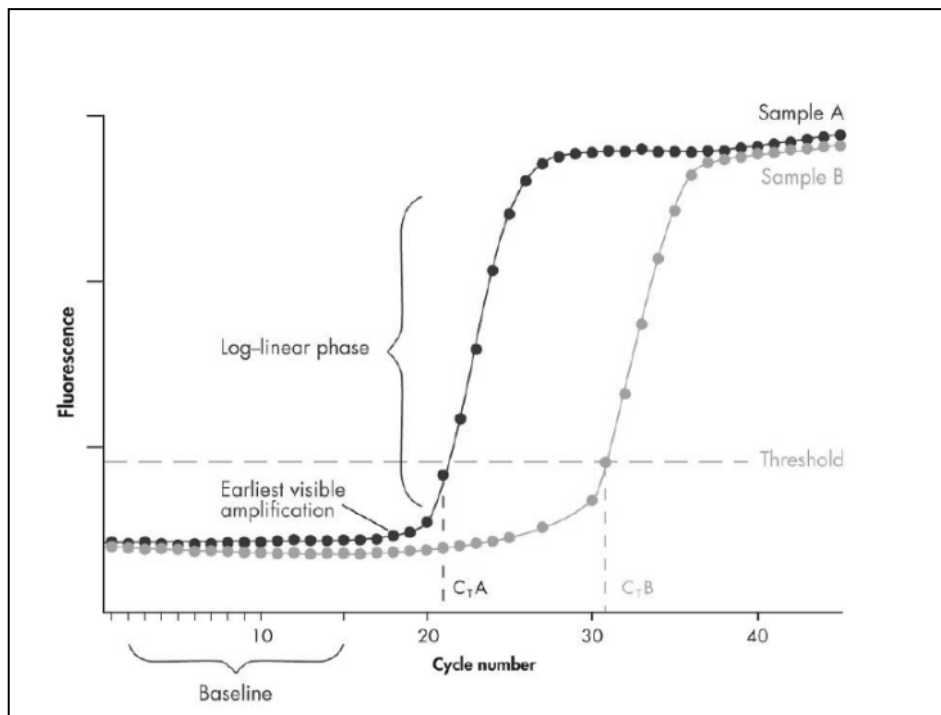


Abbildung 3: Bestimmung von Threshold und Cycle threshold (Ct) [59]. Die Abbildung zeigt den Verlauf des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der Menge des Startmaterials im Vergleich von Sample A und B. Sample B hat einen Ct von ca 30, Sample A von ca 20. Sample A braucht weniger Zyklen um mit dem Fluoreszenzsignal den Threshold zu überschreiten und ist damit, dasjenige Sample, welches in höherer Startmenge vorlag [59].

Aufgrund der vorangegangenen Preamplifikation der Proben (und der damit zusammenhängenden zusätzlichen 12 durchgeführten Zyklen) wurden alle miRNAs mit einem Ct-Wert von ≥ 30 als nicht detektierbar (und somit im Serum als nicht nachweisbar) bewertet [43, 59].

Um die endgültige Analyse und Interpretation mit der von Qiagen bereitgestellten webbasierten Software (siehe unten) beginnen zu können, mussten die bisher generierten Ct-Werte nachbearbeitet und konfiguriert werden:

1. Es wurden alle Ct-Werte mit den zugehörigen Schmelzkurven verglichen, und alle miRs mit unsauberen oder fehlenden Schmelzkurven standen nicht zur weiteren Analyse zur Verfügung.

2. *Kalibrierung*. Diese war notwendig, um die Daten der drei verschiedenen Zeitpunkte (3 Samples) eines Probanden miteinander vergleichen zu können. Die Prozedur ist nachfolgend erklärt:

Zuerst wurden in diesem Schritt alle Ct-Werte ≥ 30 mit N/A markiert und so von den folgenden Analysen ausgeschlossen.

Die Kalibrierung erfolgte anhand der Werte von cel-miR-39. Hierzu wurde aus allen 6 cel-39 Werten eines Samples (1 Sample, 3 Platten à 2 cel-39 Werten) ein Mittelwert errechnet. Pro Proband entstand so jeweils ein Mittelwert für jeden der drei verschiedenen Zeitpunkte (morgens, mittags und abends). Da diese Mittelwerte jedoch leicht voneinander abwichen, mussten diese korrigiert werden, indem die jeweilige Differenz zum größten Mittelwert (Korrekturfaktor) errechnet und zu allen, dem sample zugehörigen Ct-Werten, addiert wurden. Werte, die nun den Wert 30 erlangten oder überschritten, wurden ebenfalls als „nicht nachweisbar“ gekennzeichnet.

- *Normalisierung*. Die Normalisierung diente der Bildung eines Referenzwerts. Hierfür wurden aus allen miRs diejenigen ausgewählt, die in allen drei Samples als nachweisbar galten ($Ct < 30$). Anschließend wurde aus diesen Ct-Werten ein Mittelwert pro Sample errechnet („commonly expressed mean“).

Der jeweilige neu errechnete Mittelwert eines Samples wurde jetzt als neuer Referenzwert in jedem Sample für jede der drei Platten jeweils einmal anstelle des ersten cel-miR-39- Wertes eingesetzt. Die normalisierten Werte sind daher als relativ zu betrachten, da sie in einem Bezug zum Gesamtmittelwert stehen.

Diese vorkonfigurierten Datensätze konnten dann in die Online-Software von Qiagen [60] eingespeist werden.

Nach Einspielen der Daten in das Web-basierte Analyseprogramm, generierte dieses für jede einzelnen miR die entsprechenden Ct-Werte (Im Folgenden auch als Basis- (oder Roh-) Ct-Wert bezeichnet). Zudem konnten durch das Programm auch der fold-change berechnet werden. „Der Fold-change-Wert (fc) ist die normalisierte Genexpression ($2^{(-\Delta C_T)}$) des Test-Samples geteilt durch die normalisierte Genexpression ($2^{(-\Delta C_T)}$) des Kontroll-Sample“ [62]. Er setzt somit vereinfacht gesagt zwei Werte in ein Verhältnis zueinander. Grundsätzlich werden Werte >1 als eine Hochregulation gedeutet (Ct-Abfall) und Werte <1 werden als Herabregulation (Ct-Anstieg) betrachtet. Laut der Herstellerempfehlung werden

Werte von ≥ 0.5 für eine Herabregulation und cut-off ≥ 2 für eine Hochregulation als relevant angesehen. Diese Grenzwerte wurden für die vorliegende Arbeit übernommen.

Als Kontrollsample diente in dieser Analyse immer der morgendliche Wert eines Samples. Testsamples waren dementsprechend das mittags- und abends-Sample. Der Foldchange1 (fc1) gab in diesem Fall das Verhältnis mittags zu morgens und foldchange2 (fc2) das Verhältnis von abends zu morgens an.

Anzumerken sei hier noch, dass aufgrund des Stichprobenumfangs es in dieser Untersuchung nicht möglich gewesen ist, statistische Tests durchzuführen. Die vorliegende Studie ist daher deskriptiv bzw. qualitativ. Bedeutsame Ergebnisse werden daher auch als relevant und nicht wie in einer statistischen Untersuchung als signifikant beschrieben.

Neben dem fc wurden für die erste deskriptive Beschreibung der Datenverteilung die Roh-/Basis-Ct-Werte verwendet, welche von der web-basierte Analysesoftware ausgegeben wurden. Eine absolute molekulare Quantifizierung ist ohne Erstellen einer Standardkurve nicht möglich, welche für die Analyse dieses PCR-basierte Hochdurchsatzverfahren nicht vorgesehen ist. Diese Basis-Ct-Werte wurden für die genaueren Vergleiche der einzelnen miRs und die Untersuchung der Veränderungen im Tagesverlauf nochmals in das Verhältnis zu dem jeweiligen Sample-mean gesetzt. Hieraus ergaben sich dann die normalisierten Ct-Werte.

Der Variationskoeffizient wurde genutzt, um einen Eindruck der Streubreite der verschiedenen Werte zu bekommen. Werte $>20\%$ werteten wir als eher uneinheitlich mit großer Streubreite der Werte.

4 Ergebnisse

4.1 Überblick

Die vorliegende, auf q-PCR basierende Analyse umfasste 18 Samples (6 Probanden à 3 Messzeitpunkte) mit jeweils 1066 miRs (verteilt auf 3 Platten). Dies ergab in der Gesamtheit 19188 (18*1066) verschiedene Ct-Werte. Die Basis-Ct-Werte lagen im Bereich zwischen 14,63-30. Von den insgesamt 19188 Werten wiesen 11339 einen Basis-Ct ≥ 30 auf. Dies entsprach etwa 59% und bedeutete, dass knapp zwei Drittel der miRs im peripheren Serum nicht sicher nachweisbar waren (Abbildung 4).

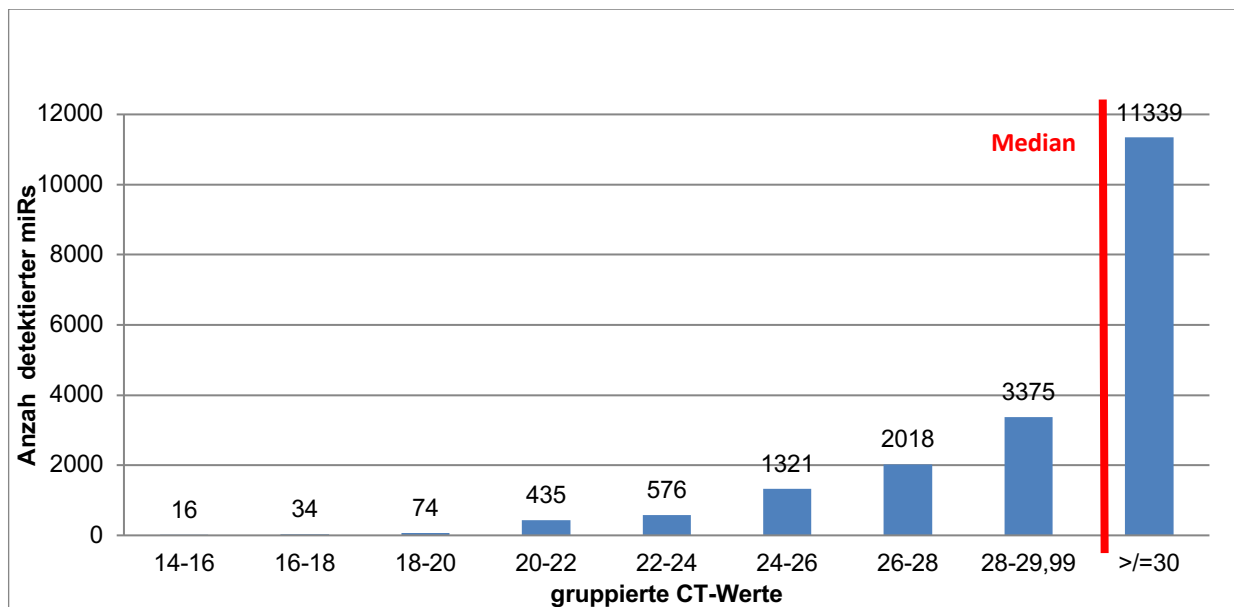


Abbildung 4: Gesamtverteilung aller Ct-Werte aller Probanden, nach Ct-Werten und deren Häufigkeit sortiert. In rot: Median (Ct =30) aller Werte.

Der Median der gesamten miR-Werte lag bei 30. Der Mittelwert (arithmetisches Mittel) der Basis-Ct-Werte lag im Durchschnitt bei 28,64. Insgesamt war also die Mehrheit der miRs in der Zirkulation nicht nachweisbar. Nach Herausnehmen der Werte ≥ 30 aus der Statistik, verschob sich der Mittelwert sowie der Median in niedrigere Ct-Bereiche. Der Mittelwert lag dann bei 26,81 und der Median bei 27,52. Im Durchschnitt wurden nach Herausnehmen der Ct ≥ 30 -Werte pro Proband noch 436,01 miRs analysiert.

Die verbliebenen 7849 Ct-Werte (excl Ct=30) sind, wie in der Abbildung schon zu vermuten ist, nicht normalverteilt [30]. Die entsprechenden statistischen Tests sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5 Statistische Tests zur Normalverteilung der Gesamtverteilung der Werte Ct<30 [nach 30]

Für n = 7.849		
Verfahren	Statistik	Normalverteilung gegeben?
Kolmogorow-Smirnow-Test mit Lilliefors-Korrektur	K = 0.11674,	NV ist nicht gegeben
	p = .00000	
Anderson-Darling-Test	A = 221.48965,	NV ist nicht gegeben
	p = .00000	

Tabelle 6: Deskriptive Statistik ohne Ct>=30. Anzahl= Anzahl analysierter miRs, MW= Mittelwert (arithmetisches Mittel) der analysierten miRs, SD=Standardabweichung des Mittelwertes, SE= Standardfehler des Mittelwertes, Min=kleinster Basis-Ct-Wert, Max= größter Basis-Ct-Wert.

Vol1	Anzahl	MW	Varainz	SD	SE	Median	Min	Max
Vol1 morgens	522	26,89990421	6,750049319	2,595595922	0,113715122	27,58	14,92	29,99
Vol1 mittags	374	26,90719251	6,455284899	2,54072527	0,131553768	27,505	16,55	29,99
Vol1 abends	483	27,03929607	6,032193707	2,456052464	0,111870124	27,72	16,4	29,98
Vol2/1								
	Anzahl	MW	Varainz	SD	SE	Median	Min	Max
Vol2/1 morgens	504	26,95242063	6,575521125	2,564277895	0,1143355	27,67	15,43	29,98
Vol2/1 mittags	403	26,82456576	6,958987591	2,637989308	0,131570948	27,52	15,63	29,99
Vol2/1 abends	493	26,85803245	7,226619861	2,688237315	0,121195098	27,59	15,43	29,99
Vol2/2								
	Anzahl	MW	Varainz	SD	SE	Median	Min	Max
Vol2/2 morgens	458	26,88434498	6,515121514	2,552473607	0,119399679	27,65	16,91	29,98
Vol2/2 mittags	353	26,45586402	7,85796703	2,803206562	0,121534418	27,04	14,8	29,97
Vol2/2 abends	459	26,87590414	7,016269063	2,648824091	0,123771421	27,58	15,57	29,97
Vol3								
	Anzahl	MW	Varainz	SD	SE	Median	Min	Max
Vol3 morgens	395	26,77359494	7,323657963	2,706225778	0,136337685	27,48	15,87	29,98
Vol3 mittags	394	26,89416244	7,06897709	2,658754801	0,134116438	27,585	15,95	29,99
Vol3 abends	419	26,71933174	7,638421033	2,763769352	0,135180378	27,54	14,67	29,99
Vol4/1								
	Anzahl	MW	Varainz	SD	SE	Median	Min	Max
Vol4/1 morgens	397	26,56390428	6,914368384	2,62951866	0,132138284	27,13	15,52	29,98
Vol4/1 mittags	378	26,91960317	6,827773123	2,613000789	0,134576387	27,595	15,71	29,99
Vol4/1 abends	467	26,80164882	7,371111414	2,714979082	0,125768977	27,62	14,63	29,99
Vol4/2								
	Anzahl	MW	Varainz	SD	SE	Median	Min	Max
Vol4/2 morgens	459	26,71823529	7,732236319	2,7806899	0,129933106	27,56	14,71	29,99
Vol4/2 mittags	441	26,75471655	7,127337391	2,669707361	0,127273305	27,5	15,04	29,97
Vol4/2 abends	450	26,78842222	7,9515124	2,81984262	0,133076601	27,49	5,22	29,99
Mittelwerte:	436,0555556	26,81284135	7,074633846	2,657992821	0,126519291	27,51972222	14,94222222	29,98388889

Betrachtete man die deskriptive Gesamtstatistik von miRs mit Ct-Werten unter 30 (

Tabelle 6) genauer, entstand auf den ersten Blick der Eindruck, dass jeweils zu den mittäglichen Zeitpunkten weniger miRs messbar waren, als am jeweiligen Morgen oder Abend. Hieraus leiteten wir die Hypothese ab, in der wir hinterfragten, ob es sich dabei um ein einheitliches circadianes Expressionsmuster im Sinne einer generellen Expressionsveränderung aller miRs zu einem bestimmten Zeitpunkt (in diesem Fall mittags) handeln könnte. Bei genauer Betrachtung fiel diese Reduktion der mittäglichen miRs insbesondere bei Vol1, Vol2/1 und Vol2/2 auf, wohingegen dieser Unterschied bei den anderen drei Probanden deutlich schwächer ausfiel. Bei denjenigen miRs, die am Mittag einen Ct-Wert von 30 lieferten (und somit aus der Statistik herausgenommen wurden) zeigte sich, dass die entsprechenden Werte am Morgen und am Abend alle im Ct-Bereich >28 lagen. Somit kamen wir zu dem Schluss, dass diese miRs grundsätzlich zu allen drei Zeitpunkten schwach exprimiert wurden und somit die verringerte Anzahl am Mittag nicht als Ausdruck einer Rhythmik interpretiert werden konnte. Angemerkt sei an dieser Stelle, dass bei Vol2/2 mittags und bei Vol4/1 morgens insgesamt weniger miRs analysiert wurden, da hier aus technischen Gründen die dritte Platte des jeweiligen Samples nicht ausgewertet werden konnte. Diese Werte, die daher alle als ≥ 30 berechnet wurden, nahmen wir aus der Analyse heraus, da dies die Interpretation verfälscht hätte.

4.2 miRs mit relevanten Expressionslevel im Serum (Kategorie „high expression level“)

Um den Fokus der Analyse auf diejenigen miRs in relevanten Mengen zu legen, wurde die Definition des „high expression level“ (kurz: hel) von Margue et al [43] übernommen. Diese hatten mit der Kategorie hel eine Gruppe von miRs eingegrenzt, die aufgrund deren Erfahrungswerte, in biologisch/klinisch relevanten Mengen vorlagen. Definitionsgemäß zählten zu der Kategorie hel diejenigen miRs, die in 80% der untersuchten Samples einen Ct-Wert von ≤ 27 aufwiesen [43]. In dem nun vorliegenden Fall ergaben sich daraus 166 miRs. Dies errechnete sich wie folgt: 6 Probanden mit jeweils 3 Entnahmezeitpunkten ergaben insgesamt 18 Samples ($6 \cdot 3$) à 1066 miRs. Dies bedeutete wiederum 18 Werte pro miR. Zur Erfüllung der hel-Definition mussten 80% dieser 18 Werte einen Ct-Wert ≤ 27 aufweisen. Das entsprach im vorliegenden Fall 14,4 Werten. Schlussendlich wurden hier alle miR in die Kategorie hel eingeordnet, bei denen 14 von 18 Ct-Werten ≤ 27 waren. Diese Bedingung erfüllten 166 miRs. Für die weiteren detaillierten Analysen wurden dann ausschließlich diese 166 miRs genutzt (Abbildung 5).

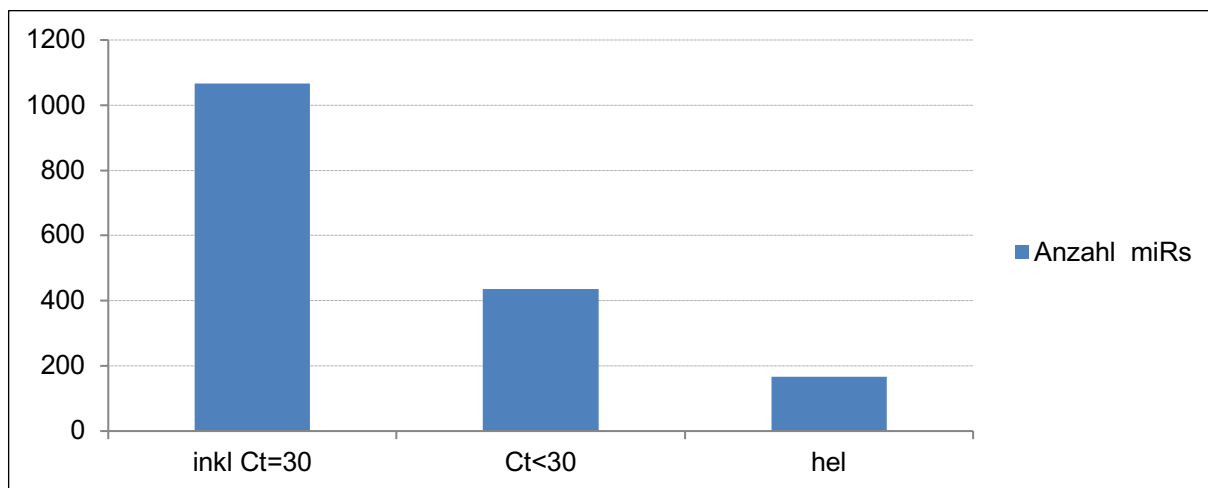


Abbildung 5: durchschnittliche Anzahl analysierter miRNs pro Proband. inkl. Ct= 30: alle CT Werte inklusive Ct=30. Ct<30: alle Ct-Wert <3., hel: high expression level.

Auch für die hel Gruppe wurde eine erste deskriptive Übersicht zusammengestellt und in Tabelle 8 zusammengefasst. Die Basis-Ct-Werte lagen zwischen 15,50 und 27,67. Der durchschnittliche Mittelwert betrug in dieser Kategorie 24,14. Der Median war 24,71.

Auch die Werte der hel-Gruppe (18*166= 2988) sind, ebenso wie die Gesamtgruppe, nicht normalverteilt [30]. Auch hier sind die entsprechenden Tests in (Tabelle 7) zusammengefasst.

Tabelle 7: Statistische Tests zur Normalverteilung hel [nach 30]

Für n = 2.988		
Verfahren	Statistik	Normalverteilung gegeben?
Kolmogorow-Smirnow-Test mit Lilliefors-Korrektur	K = 0.10675,	NV ist nicht gegeben
	p = .00000	
Shapiro-Wilk-Test	W = 0.93950,	NV ist nicht gegeben
	p = .00000	
Anderson-Darling-Test	A = 56.92638,	NV ist nicht gegeben
	p = .00000	

Als Ganzes betrachtet konnte auch bei dieser Gruppierung, wie schon bei der Gesamtheit der miRNs, keine einheitliche Rhythmik dargestellt werden (Abbildung 6). Unterstützt wurde diese Erkenntnis durch einen Gesamt-fc1=1,22 und Gesamt-fc2=1,22, welche sich jeweils als Durchschnitt aller fc der 166 miRNs berechneten. Der Variationskoeffizient der Mittelwerte war 1%.

Tabelle 8: Deskriptive Statistik hel. Anzahl=Anzahl analysierter miRs, MW= Mittelwert der analysierten miRs, SD=Standardabweichung des Mittelwertes, SE=Standardfehler des Mittelwertes, Min=kleinster Basis-Ct-Wert, Max= größter Basis-Ct-Wert.

Vol1								
	Anzahl	MW	Varainz	SD	SE	Median	Min	Max
Vol1 morgens	166	23,84746988	4,468833358	2,113961532	0,164571682	24,42	14,92	27,08
Vol1 mittags	166	24,62445783	4,279813863	2,0687711	0,161053612	25,18	16,55	28,37
Vol1 abends	166	24,2746988	4,047888765	2,011936571	0,15662905	24,775	16,4	27,54
Vol2/1								
	Anzahl	MW	Varainz	SD	SE	Median	Min	Max
Vol2/1 morgens	166	23,98572289	4,593616044	2,143272275	0,16685352	24,485	15,43	27,09
Vol2/1 mittags	166	24,28789157	4,769880494	2,184005608	0,170024606	25,06	15,63	27,52
Vol2/1 abends	166	23,77746988	4,793173117	2,18933166	0,170439239	24,425	15,43	26,97
Vol2/2								
	Anzahl	MW	Varainz	SD	SE	Median	Min	Max
Vol2/2 morgens	166	24,09578313	4,035515953	2,008859366	0,15638949	24,665	16,91	28,18
Vol2/2 mittags	166	24,41138554	7,73908543	2,781921176	0,21657227	24,625	14,8	30
Vol2/2 abends	166	24,00692771	4,751117669	2,179705868	0,169689872	24,6	15,57	27,44
Vol3								
	Anzahl	MW	Varainz	SD	SE	Median	Min	Max
Vol3 morgens	166	24,24813253	5,22576579	2,285993392	0,177964344	24,985	15,87	27,7
Vol3 mittags	166	24,36246988	4,645258358	2,155286143	0,167788799	25,11	15,95	27,28
Vol3 abends	166	24,03150602	5,434248937	2,331147558	0,181479591	24,67	14,67	27,22
Vol4/1								
	Anzahl	MW	Varainz	SD	SE	Median	Min	Max
Vol4/1 morgens	166	24,40198795	7,004482193	2,64659823	0,206037393	24,56	15,52	30
Vol4/1 mittags	166	24,54837349	4,593190728	2,143173051	0,166845796	25,2	15,71	27,4
Vol4/1 abends	166	23,85385542	5,29362369	2,300787624	0,179116074	24,425	14,63	26,97
Vol4/2								
	Anzahl	MW	Varainz	SD	SE	Median	Min	Max
Vol4/2 morgens	166	23,72584337	5,268770072	2,295380158	0,178695103	24,465	14,71	26,88
Vol4/2 mittags	166	23,97156627	4,865230077	2,205726655	0,171715587	24,485	15,04	27,15
Vol4/2 abends	166	24,0613253	4,879256075	2,208903817	0,171962929	24,635	15,28	27,3
Mittelwerte:	166	24,13982597	5,038263923	2,236375655	0,174101609	24,70944444	15,50111111	27,67166667

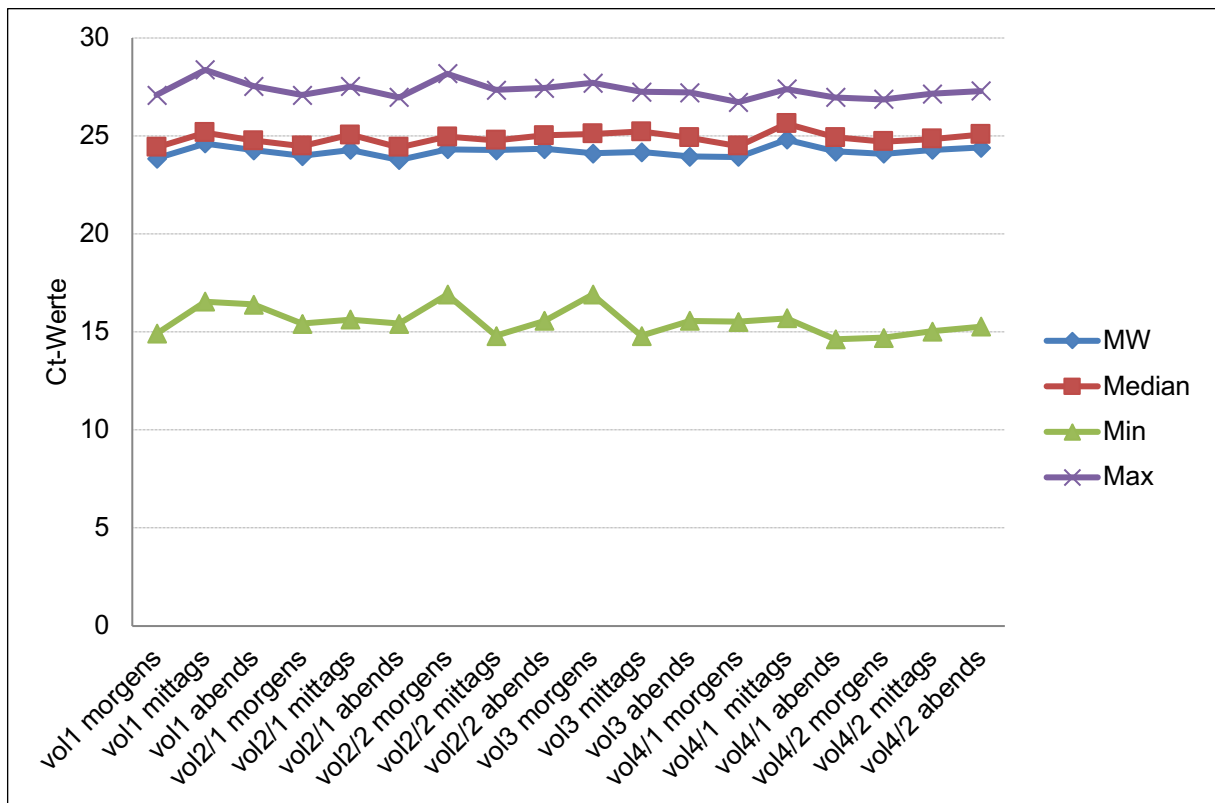


Abbildung 6: Übersicht der miRs der Kategorie high expression level: alle statistischen Werte wiesen bei allen Probanden zu den verschiedenen Zeitpunkten ähnliche Werte auf. Eine einheitliche Rhythmik ließ sich nicht feststellen. (MW= Mittelwert, Min= minimaler Ct-Wert, max = maximaler Ct-Wert).

Im Rahmen der detaillierten Analyse der hel-miRs wurden zuerst diejenigen miRs mit dem höchsten Expressionslevel ausgesucht. Die miR mit dem kleinsten Basis-Ct-Wert war miR-451a. Ihr folgten in absteigender Folge miR-16-5p, miR-195-5p, miR-223-3p, miR-92a-3p. Diese wiesen alle einen Basis-Ct-Wert von <20 auf. Insgesamt fanden sich 16 miRs die Basis-Ct-Wert von <21 (normalisierter Ct-Wert <0,8) aufwiesen (Tabelle 9). Der Durchschnitt der Variationskoeffizienten der Mittelwerte betrug 2,3%. Zudem wiesen sie alle einen $fc < 2$ auf und gelten damit als konstant exprimiert.

Tabelle 9: miRs mit kleinsten Mittelwerten. MW = arithmetisches Mittel aller normalisierten Ct-Werte einer miR, MW-fc1= arithmetisches Mittel der 6 fc1 einer miR, MW-fc2= arithmetisches Mittel der 6 fc2 einer miR.

	MW (Roh-Ct)	MW (Ct normalisiert)	MW-fc1	MW-fc2
hsa-miR-223-3p	18,414444	0,6988042	1,0450667	1,2113667
hsa-miR-92a-3p	18,558889	0,704226	1,1857333	1,1949
hsa-miR-126-3p	20,378333	0,7734143	1,2713333	1,1306167
hsa-miR-24-3p	20,577222	0,7802678	1,4345833	1,1769
hsa-miR-486-5p	20,561111	0,7060346	1,0226833	1,1877667
hsa-miR-16-5p	18,607222	0,6710876	1,34335	1,3026167
hsa-miR-195-5p	20,793333	0,6914991	1,0765667	1,2470833
hsa-miR-21-5p	21,010556	0,7625678	1,4257	1,3017167
hsa-miR-451a	17,684444	0,5881805	1,3472667	1,3326667
hsa-miR-1280	18,222778	0,775593	1,3225333	1,28465
hsa-miR-25-3p	20,585	0,7808676	1,2609333	1,67575
hsa-miR-23a-3p	20,091667	0,789109	1,2729667	1,0918
hsa-miR-27a-3p	21,046667	0,7974055	0,8649	1,0646333
hsa-miR-20a-5p	15,501111	0,7811459	1,5061333	1,5145167
hsa-miR-221-3p	20,437778	0,7986957	1,0531833	0,8673167
hsa-miR-1281	21,030556	0,7981104	1,1076167	0,9165

Als nächstes erfolgte die Selektion von miRs, die ein möglichst einheitliches Expressionslevel zu allen drei Tageszeiten boten und somit als konstant exprimiert angesehen werden konnten. Die 10 miRs mit der kleinsten Standardabweichung sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: 10 miRs mit konstantem Expressionslevel. MW = arithmetisches Mittel aller normalisierten Ct-Werte einer miR, MW-fc1= arithmetisches Mittel der 6 fc1 einer miR, MW-fc2= arithmetisches Mittel der 6 fc2 einer miR.

	MW (Roh-Ct)	MW (Ct normalisiert)	MW-fc1	MW-fc2
hsa-miR-766-3p	24,9633333	0,94727434	0,79585	0,91035
hsa-miR-378a-3p	25,7238889	0,97620206	1,06076667	1,05373333
hsa-miR-197-3p	24,0783333	0,91375618	0,98738333	0,83368333
hsa-miR-151a-5p	24,8733333	0,943928	1,05286667	1,00888333
hsa-let-7d-3p	24,5377778	0,93117021	0,93575	1,05353333
hsa-miR-324-3p	24,8572222	0,94323131	0,99223333	1,15216667
hsa-miR-320b	24,4572222	0,92813937	1,06041667	1,0083
hsa-miR-423-5p	21,99	0,83451189	1,07855	0,90221667
hsa-miR-1260a	21,7305556	0,82464064	0,85078333	0,83906667
hsa-miR-374c-5p	26,8261111	1,001251	1,11731667	0,90413333

Sie wiesen alle eine normalisierte Standardabweichung kleiner 0,011 auf. Der Mittelwert des Varianzkoeffizienten betrug 1,1%. Den kleinsten Variationskoeffizienten (VC=0,006) bot miR-

320b (Abbildung 7). Sie war somit diejenige miR, die die kleinste Streubreite aller Werte aufwies. Zudem ergaben sich für die beiden fold-change-Werte $fc1=1,06$ und $fc2=1,01$. Somit konnten wir dieser miR ein eindeutig zu allen drei Zeitpunkten konstantes Expressionslevel und somit keine rhythmische Expressionsänderungen nachweisen. Ebenfalls traf dies für die anderen 9 miRs zu.

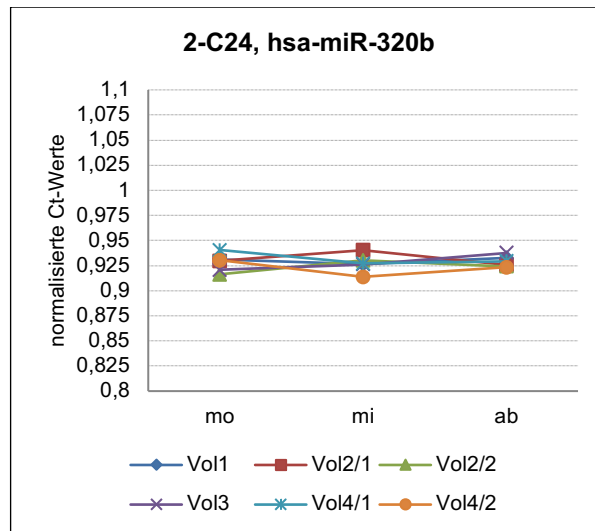


Abbildung 7: Zeitverlauf der Ct-Werte von miR-320b

4.2.1 miRs mit Expressionsveränderungen

Es fanden sich insgesamt 11 miRs, die Schwankungen in den Expressionsleveln zu den verschiedenen Zeitpunkten darboten. Dies entsprach 6,6% der miRs aus der hel-Kategorie. An dieser Stelle sei auch erläutert, dass im Folgenden einzelne (stark von der Menge abweichende) Werte aus den (Mittelwert-)Berechnungen herausgenommen wurden. Dies soll der Verdeutlichung der entsprechenden Ergebnisse im Rahmen der deskriptiven Beschreibung dienen, da bei lediglich 6 Messwerten pro Zeitpunkt ein oder zwei „Ausreißer“ den entsprechenden Mittelwert stark beeinflussen können. Die dadurch entstandenen Werte werden im Folgenden dann als „korrigiert“ bezeichnet.

Zum besseren Verständnis werden hier nochmals die Probanden-Titel erläutert: Proband 1-4 werden als Vol1-Vol 4 beschreiben. Da Proband 2 und Proband 4 beide eine Woche später nach Erstprobenentnahme nochmals zur Blutentnahme antraten, werden diese beiden zusätzlich als VolX/1 (Proband X in Woche 1) und VolX/2 (Proband X in Woche 2) benannt. Proband 1 und 3 spendeten jeweils nur in Woche 1 Blut und werden daher bei nur als Vol1 und Vol3 bezeichnet.

4.2.1.1 miRs mit fallenden Ct-Werten im Tagesverlauf

In diese Kategorie konnten drei miRs einsortiert werden: miR-375, miR-365b-3p sowie miR-143-3p. Ihnen konnte allen ein im Tagesverlauf (im Vergleich zu morgens) reduzierter Ct-Wert nachgewiesen werden. So zeigte miR-375 einen durchschnittlichen fc1 von 2,11 und damit eine relevante Expressionssteigerung am Mittag. Der fc2 hingegen hatte einen Wert von 1,70. Hier waren der fold-change und damit die Expressionssteigerung nicht mehr signifikant. Ein Beibehalten des erhöhten Expressionsniveaus ist aber denkbar. Unterstützt wird diese These durch die genauere Betrachtung des fc2. Hier ließen sich durch das Ausschließen der Werte von Vol1 und Vol2/2 ein korrigierter fc2=1,98 errechnen. Hierbei reduzierte sich der VC (Variationskoeffizient) von 35% auf 23%. miR-375 zeigte also eine relevante Expressionssteigerung am Mittag, die tendenziell am Abend weiter erhalten blieb (Abbildung 8).

miR-143-3p hingegen wies bei erster Betrachtung erst am Abend eine signifikante Ct-Reduktion auf (fc2 1,96). Der fc1 war 1,78 und somit nicht relevant. Der VC des fc1 ließ sich auf 46% bestimmen. Nach Reduktion auf 20% durch Elimination der Werte von Vol1 und Vol2/2 war hier ebenfalls ein relevanter korrigierter Wert von fc1=2,23 herauszuarbeiten. So ließ sich letztendlich auch bei miR-143-3p eine bereits am Mittag beginnende Expressionssteigerung feststellen (Abbildung 8).

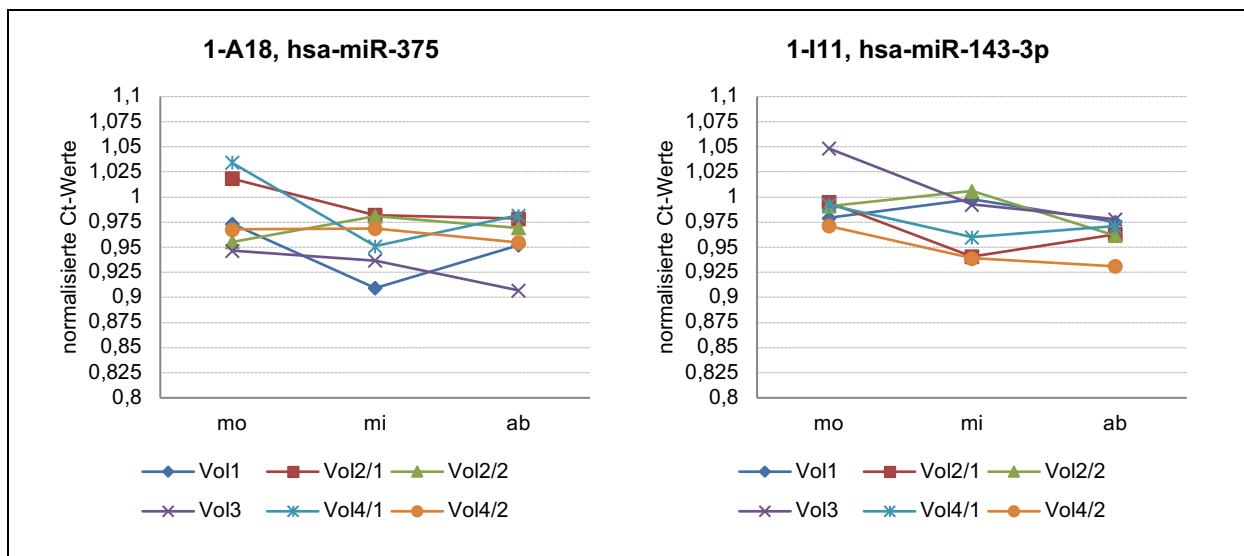


Abbildung 8: Zeitverlauf der Ct-Werte von miR-375 und miR-143-3p

Bei der dritten miR dieser Kategorie, miR 365-3p, zeigte sich auf den ersten Blick keine signifikante Expressionsänderung (fc1= 1,47; fc2= 1,73). Betrachtete man die fc2-Werte etwas genauer, fiel ein VC von 31% auf. Nach Ausklammern der Werte von Vol3 ergaben

sich eine korrigierte VC =8% sowie ein korrigierter $fc_2 = 1,97$, womit sich eine sichtbare Veränderung am Abend zeigte (Abbildung 9). Durch den nicht relevanten, aber etwas erhöhten $fc_1=1,47$ ist eine kontinuierliche Expressionssteigerung wahrscheinlich.

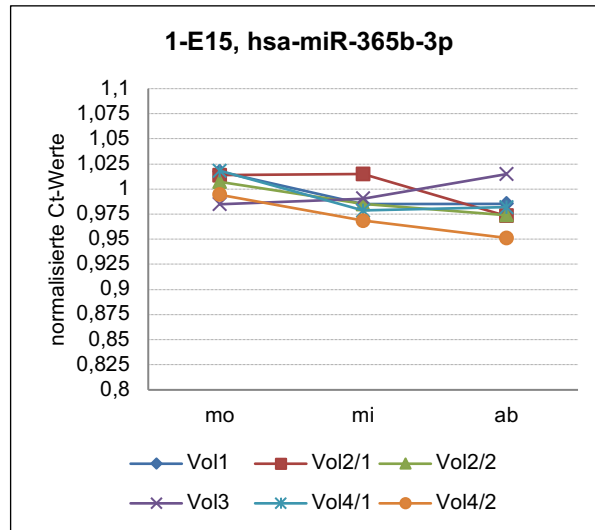


Abbildung 9: Zeitverlauf der Ct-Werte von miR-365-3p

4.2.1.2 miRs mit Ct-Maximum am Mittag

Die Ergebnisse dieser Kategorie waren auf den ersten Blick weniger offensichtlich im Vergleich zu denjenigen in der voran genannten Gruppe. So präsentierte miR-1207-5p einen durchschnittlichen fc_1 -Wert von 0,60. Bei detaillierterer Betrachtung fiel dann ein VC des fc_1 von 44% auf. Durch das Ausschließen der Werte von Vol3 und Vol4/2 ergab sich ein korrigierter VC von 18% sowie ein korrigierter $fc_1=0,42$. miR-1207-5p wies somit ein Expressionstief am Mittag bei vergleichbar exprimierten Werten von morgens und abends auf ($fc_2=0,77$) (Abbildung 10). miR-92b-5p zeigte ebenfalls eine bedeutsame Expressionsänderung am Mittag. Der fc_1 reduzierte sich nach Elimination der Werte von Vol3 und vol4/2 von 0,80 auf einen dann relevanten Wert von 0,53 ($fc_2=0,92$). Der korrigierte VC fiel auf 16% (Abbildung 10). Beide miRs lieferten also ein Maximum der Ct-Werte am Mittag mit einer relevanten Veränderung im Vergleich zum Morgen und unterlagen somit einer Expressionsregulation am Mittag. Einen annähernd ähnlichen Verlauf (jedoch ohne eindeutig relevanten fc -Wert) besaß miR-1183. Auch hier ließ sich nach Korrektur des fc_1 durch Herausnehmen des Wertes von Vol3 die VC von 51% auf 14% reduzieren und der fc_1 veränderte sich von 0,77 auf 0,60 (Abbildung 10). Alle drei miRs zeigten somit ein Expressionsminimum am Mittag.

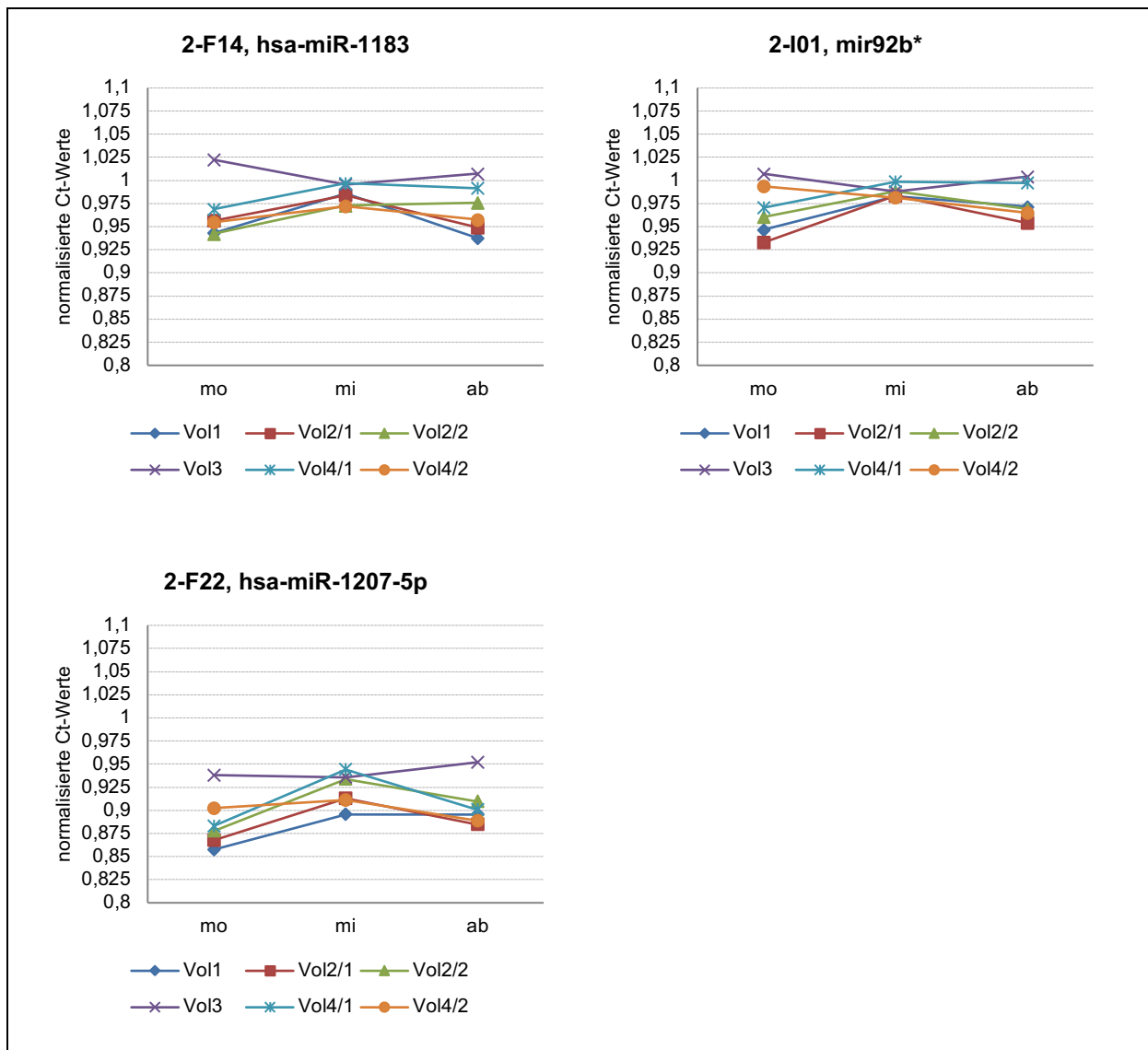


Abbildung 10: Zeitverläufe der Ct-Werte von miR-1183, miR-92b und miR-1207-5p. alle wiesen maximale CT Werte am Mittag auf und zeigten somit ein Expressionstief am Mittag.

4.2.1.3 miRs mit Ct-Minimum am Mittag

In dieser Kategorie kristallisierte sich als erstes miR-637 heraus (Abbildung 11). Es ergab sich ein fc1 von 1,97. Der korrigierte VC (ohne Vol2/2 und Vol3) war 25. Der fc2 lag bei 0,98. Eine ähnliche Konstellation zeigte sich bei miR-628-3p (Abbildung 11). Bei dieser miR lag der korrigierte fc1 (ohne Vol2/2 und Vol3) bei 1,97, jedoch mit einem VC von 8% (zuvor VC=30%). Fc2 zeigte hier einen Wert von 1,06. Beide miRs präsentierten also gleichermaßen ein Minimum der Ct-Werte und damit eine gesteigerte Expression der miRs am Mittag (Abbildung 11).

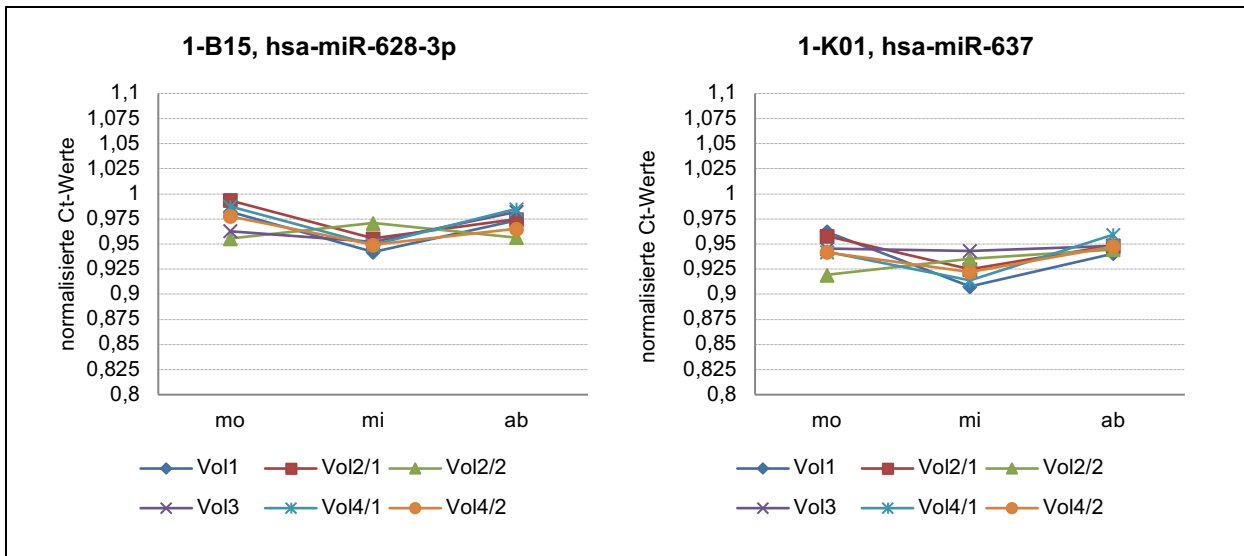


Abbildung 11: Zeitverläufe der Ct-Werte von miR-628-3p und miR-637. Beide miRs zeigten Ct-Minima am Mittag und somit eine Expressionssteigerung am Mittag.

Für drei weitere miRs fand sich ein Expressionsmaximum am Mittag jeweils für die Hälfte der Probanden.

Bei miR-144-3p waren dies Vol2/1, Vol2/2 und Vol4/1 mit einem fc1-Mittelwert von 3,03, VC =20%. miR-144-3p war somit die miR mit den ausgeprägtesten Veränderungen. Der Mittelwert aller Probanden ergab fc1= 1,93, VC =61%.

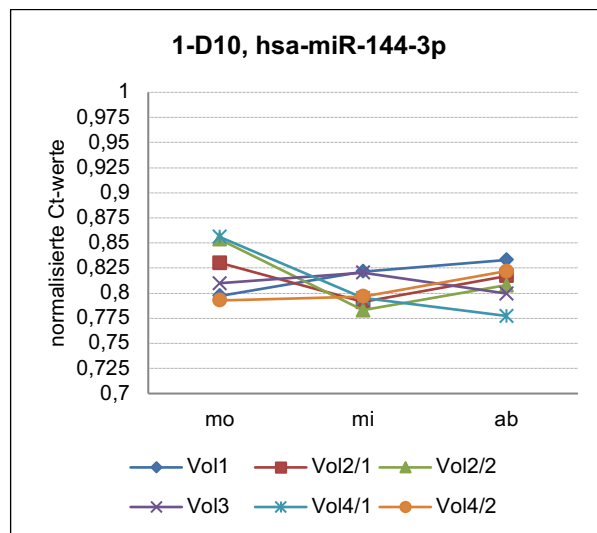


Abbildung 12: Zeitverlauf der Ct-Werte von miR-144-3p

Bei den anderen beiden miRs handelte es sich um miR-133b und miR-1289-5p. Bei miR-1289-5p zeigten Vol1, Vol2/2 und Vol3 ein erhöhtes Expressionslevel. Somit war der

korrigierter $fc1 = 2,00$ (nach Ausschluss von Vol2/2, Vol4/1 und Vol4/2). $fc2$ blieb weiter mit $fc2=1,21$ nicht relevant verändert im Vergleich zum morgendlichen Ausgangswert.

Ein korrigierter $fc1$ von 1,88 ergab sich für miR-133b nach Herausnehmen von Vol2/2, Vol3 und Vol4/1 (Abbildung 13).

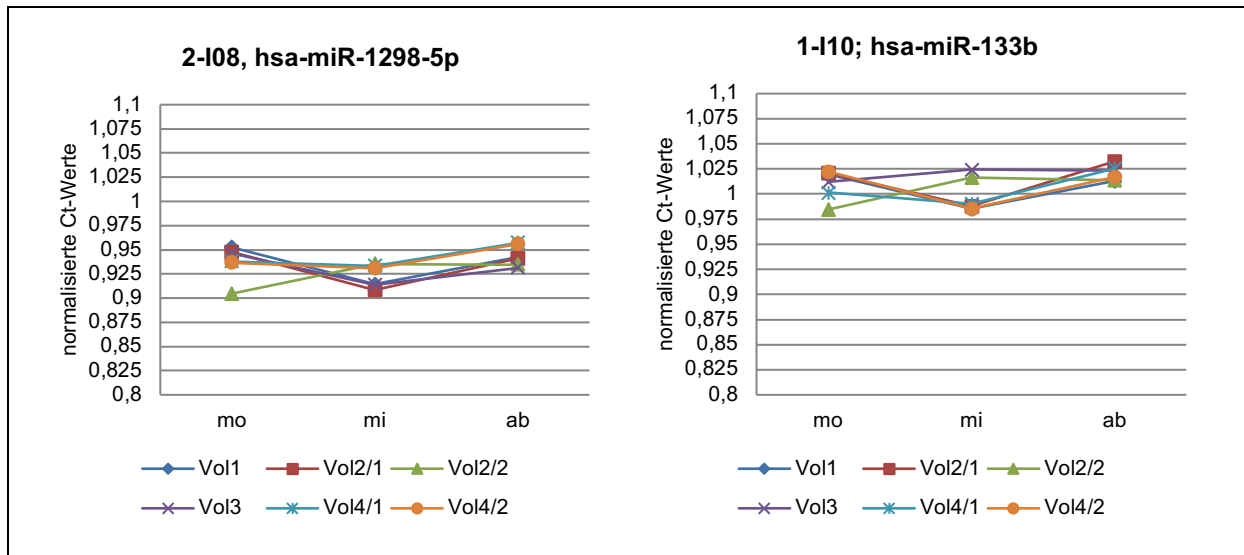


Abbildung 13: Zeitverläufe der Ct-Werte von miR-1298-5p und miR-133b. Für beide miRNAs konnte bei jeweils drei der Probanden ein Ct-Minimum am Mittag nachgewiesen werden.

4.2.2 Vergleich Woche 1 und Woche 2

Um die Reproduzierbarkeit zu prüfen, erfolgte bei zwei der vier Probanden (Vol2 und Vol4) eine erneute Probenentnahme genau eine Woche später nach dem exakt gleichen Prozedere (siehe Kapitel 3.1).

Bei Betrachtung der Ct-Rohwerte zeigten sich ähnliche Werte wie bei der Gesamtbetrachtung. So waren bei beiden Probanden sowohl zum ersten als auch zum zweiten Zeitpunkt rund 60 % der Werte mit einem Ct-Wert ≥ 30 (Tabelle 11).

Tabelle 11: Vergleich der Ct-Werte ≥ 30 zwischen Woche 1 und Woche 2

	Vol2/1	Vol2/2	Vol4/1	Vol4/1
Anteil der miRs mit Ct ≥ 30	59%	66%	65%	58%

Darüber hinaus verglichen wir die einzelnen Werte von Woche 1 und 2 des jeweiligen Probanden miteinander. Hierfür setzten wir die beiden Werte ins Verhältnis zueinander. Je näher der Wert dann an 1 heranreichte, als desto ähnlicher wurden die beiden Werte gewertet. Insgesamt ergab sich hierdurch eine hohe Ähnlichkeit der Werte. Für Vol2 ergeben

sich für die 166 miRs des hel zu allen drei Zeitpunkten Werte zwischen 0,92 und 1,04 (Tabelle 12). Bei Proband Vol4 ergaben sich kleinere Abweichungen. So zeigte sich beim Vergleich der morgendlichen Ct-Werte Vergleichs-Werte von 0,87-1,06. bei genauerer Betrachtung, dass es sich bei diesen „etwas verschiedener exprimierten miRs“ um lediglich 18 von 166 miRs handelte. Alle anderen 148 miRs ergaben Werte von 0,93-1,06 (Tabelle 12). Das Gleiche galt für die miRs am Mittag und am Abend.

Tabelle 12: Vergleich zwischen Woche 1 und 2 von Proband 2 und 4. „Min-Max“: kleinster Wert und größter Wert wenn alle Tageszeiten betrachtet werden. „MW“ ist das arithmetische Mittel aller miRs von Woche1 zu Woche 2, jeweils in Bezug auf die Tageszeit (alle Werte spiegeln das Verhältnis von Woche 2 zu Woche 1 wieder).

	Vol2			Vol4		
	mo	mi	ab	mo	mi	ab
Min –Max	0,91929903 - 1,08187741			0,86956522 - 1,05743488		
MW aller miR (Woche2 zu Woche1)	0,99269201	1,00239649	0,99508409	0,96869559	0,98921324	0,99348929

4.2.3 Vergleich mit dem Kooperationspartner Luxemburg

Die vorliegende Analyse wurde in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephanie Kreis der Universität Luxemburg durchgeführt. Diese beschäftigte sich unter anderem mit dem Vergleich von miRs zwischen gesunden Probanden und Melanom-Patienten. [6, 43, 53]. In der zuletzt genannten Analyse von Margue et al sind 23 Samples von gesunden Probanden untersucht worden. Darunter 16 der 18 in dieser Arbeit entstandenen Circadian-samples. Es wurde ebenfalls das komplette miRNome mit 1066miRs analysiert. Dies, sowie die gleiche Präanalytik, machten einen direkten Vergleich möglich (Abbildung 14).

Bei Betrachtung des Anteils derjenigen miR, die als „nicht-detektierbar“ ($Ct \geq 30$) definiert wurden, findet sich sowohl bei Margue et al (im Folgenden als „LUX“ bezeichnet) als auch in der vorliegenden Arbeit (im Folgenden als „HOM“ bezeichnet) ein Anteil von circa 60% (59% HOM vs 63% LUX). Ein Unterschied fand sich im Bereich der miRs, die in die Kategorie hel eingruppiert wurden. Während hierunter 166miRs (15,6% in HOM) in der vorliegenden Arbeit fielen, waren es in Luxemburg nur circa die Hälfte, nämlich 7,6% (81 miRs) der insgesamt 1066 analysierten miRs. Beim Vergleich zwischen den miRs mit Fluktuationen waren weniger Übereinstimmungen zu finden. Margue et al beschrieben in ihrer Arbeit 30 miRs die in ihrer Analyse eine Standardabweichung >1 der Basis-Ct-Daten hatten [43]. In der

vorliegenden Arbeit konnten zu diesen Bedingungen nur 6 miRs gefunden werden. Darunter keine aus der hel-Gruppe. Beim Vergleich der miRs mit SD >1 zwischen LUX und HOM war miR-1236-3p die einzige Übereinstimmung. Des Weiteren wurden in der LUX-Gruppe 7 miRs (miR-133b, miR-637, miR-10a-5p, miR-3176, miR-2776-3p, miR-1298-5p, miR-1471) eine Expressionssteigerung und einer miR eine Expressionsminderung (miR-326) am Mittag zugeschrieben. In unserer Arbeit hingegen ließen sich (wie oben beschrieben) lediglich 11 miRs mit Expressionsveränderungen finden. Zwischen den miRs mit Expressionssteigerung am Mittag konnte für 3 miRs eine Übereinstimmung gefunden werden. Dies waren miR-637, miR-133b und miR-1298-5p.

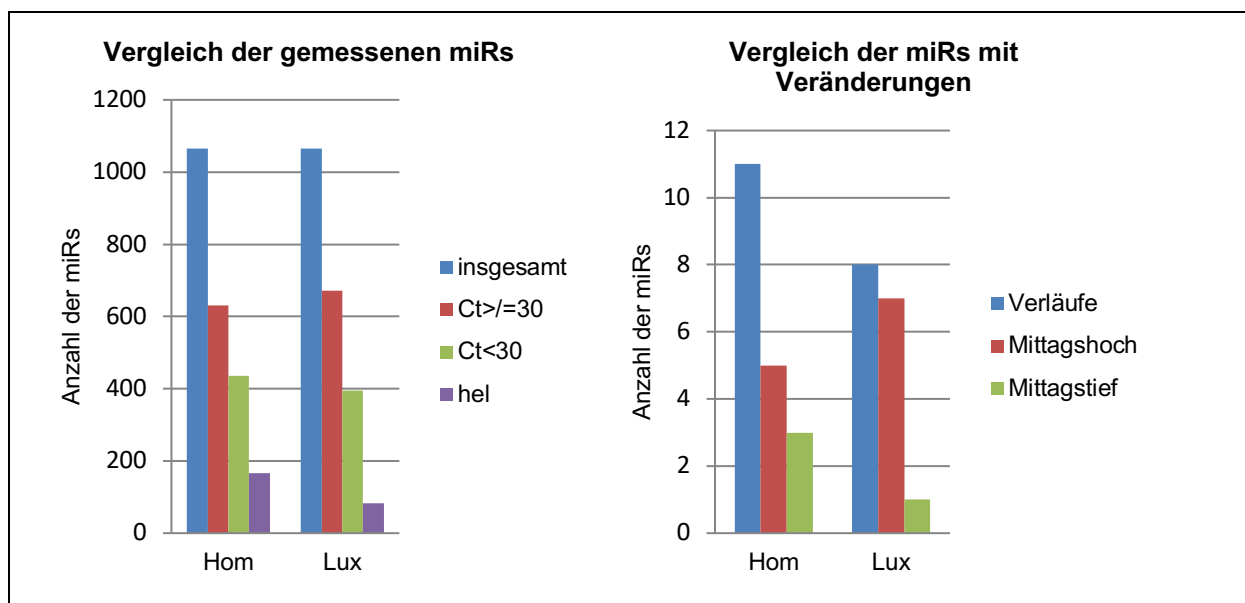


Abbildung 14: Vergleich zwischen Homburg und Luxemburg. Links: Vergleich der Anzahl der analysierten miRs in Hom und Lux. Rechts: Vergleich der miRs mit Expressionsveränderungen, blau: Anzahl der miRs mit irgendeinem Verlauf. Rot: Anzahl der miRs mit einem Expressionsmaximum am Mittag. Grün: Anzahl der miRs mit einem Expressionsminimum am Mittag.

5 Diskussion

Ein Großteil der bisher durchgeführten Studien, die sich mit zirkulierenden miRs beschäftigen, fokussieren ihre Suche auf Biomarker für verschiedenen Krebsarten und andere Erkrankungen. Doch um die miRs im klinischen Alltag für Diagnostik, Prognostik oder gar Therapie nutzen zu können [12, 14, 55], ist ein fundiertes Wissen über die physiologische Funktionsweise und mögliche Einflussfaktoren der miRs essentiell. Erst darauf basierend ist eine fundierte Analyse von pathologischen Zuständen möglich [28]. Denn abgesehen von den noch vielen offenen Fragen bezüglich der Tumor- oder Krankheitsentstehungen und die Rolle der miRs in diesem Zusammenhang, gibt es eine Vielzahl an biologischen, physiologischen und personenbezogenen Faktoren, die möglicherweise die Expressionslevel der miRs beeinflussen und bisher nur selten berücksichtigt wurden [86].

5.1 Zirkadianik

In unserer qPCR-basierte Array-Analyse waren rund 60% der miRs aufgrund von zu hohen Ct-Werten ($Ct \geq 30$) nicht sicher nachweisbar. Eine ähnliche Expressionsausprägung wird in einer miRNome-Untersuchung von Margue et al [43] beschrieben. Hier waren ebenfalls nur rund 40 % der gemessenen miRs überhaupt im Serum messbar. Einige Arbeitsgruppen [33, 67] berichten, dass die Mehrheit der miRs intrazellulär vermutet werden. Dies passt insofern zu unseren Ergebnissen, dass in unserer Analyse der Zirkadianik miRs im Serum, also im Extrazellulärraum, untersucht wurden (siehe Kapitel 3). Ein gemeinsamer, das gesamte miRNome betreffender, Expressionsrhythmus konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Keller et al berichtet ebenfalls von einer (jedoch lediglich bei einer einzelnen Person gemessenen) hohen Korrelation der Duplikatmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten [32]. In der Gesamtheit betrachtet zeigte sich bei uns eine eher homogen anmutende Verteilung der miRs zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Kritisch muss hier angemerkt werden, dass für eine umfassende zirkadiane Untersuchung Werte auch nachts hätten erhoben werden sollen.

Erwähnt sei an dieser Stelle auch, dass bei der qPCR, von Vol2/2 des Mittags-samples und bei Vol4/1 des Morgens-sample jeweils die dritte Platte des jeweiligen Samples einen Defekt in der Analyse aufgewiesen hatte und somit dort alle Werte automatisch $=30$ gesetzt wurden. Eine Interpretation der miRs, die auf dieser dritten Platte lokalisiert waren, ist damit nur sehr eingeschränkt möglich. Unter Berücksichtigung dieses Defektes kann man spekulieren, dass

die Mengen an miRNAs mit Ct <30 bei den besagten Probanden zu den besagten Zeitpunkten tendenziell etwas höher sein müssten.

Nichtsdestotrotz konnten in Einzelanalysen verschiedene miRs mit variablen Expressionsleveln im Tagesverlauf nachgewiesen werden, was auch Vodala berichtet [77]. In unserem Fall betraf dies elf miRs (vgl Kapitel 4.2.1). Zehn der elf miRs mit einer tageszeitlich veränderten Expression zeigten diese Veränderung bereits am Mittag. In der Untersuchung von Margue et al konnte für acht miRs ein Expressionsveränderung am Mittag nachgewiesen werden [43]. Im direkten Vergleich fanden sich 3 Übereinstimmungen: miR 637, miR-133b und miR 1298-5p. (vgl Kapitel 4.2.3). Diese drei miRs präsentierten in beiden Untersuchungen eine Steigerung der Expression am Mittag. Die Unterschiede sind aus unserer Sicht, bei gleicher Analysetechnik, vermutlich auf die unterschiedliche Zusammensetzung der untersuchten Gruppen zurückzuführen. Das Probandenkollektiv der vorliegenden Analyse war sehr homogen aus rein männlichen Probanden in ähnlichem Alter (24 Jahre-26 Jahre) ausgewählt worden. Im Gegensatz dazu bestand bei Margue et al das untersuchte Kollektiv sowohl aus Männer als auch Frauen mit zudem deutlich größerer Alterspanne (21 Jahre - 61 Jahre) [43]. Beide Variablen (Alter und Geschlechterunterschied) werden im späteren Verlauf als potenzielle Einflussfaktoren noch weiter beleuchtet (vgl Kapitel 5.3).

Die Beobachtung tageszeitlicher Schwankung einzelner miRs konnte ebenfalls bereits in verschiedenen tierexperimentellen zirkadianen Untersuchungen gezeigt werden [51, 66, 77, 89]. So fand man in einer Untersuchung von Mäuseserum einen oszillierenden Tagesverlauf von miR-494 und miR-152 mit zwei unterschiedlichen Peaks (1. Peak: mittags, 2. Peak: nachts) [64]. An dieser Stelle sei nun die Schwierigkeit der Vergleichbarkeit der einzelnen Studien durch Analysen an unterschiedlichen Spezies (beispielsweise Maus [64] oder Drosophila [89]) und darüber hinaus auch zusätzlich an unterschiedlichen Geweben (u.a. Zellkulturen [82], Plasma/Serum[46]) angeführt. Dadurch wird ein direkter Vergleich der Ergebnisse, sowie eine anschließende Interpretation schwierig. Die Divergenz der Ergebnisse lässt sich am Beispiel miR-142-3p veranschaulichen. miR-142-3p war in der hiesigen Untersuchung in humanem Serum in bedeutsamer Menge (hel) nachweisbar, zeigte aber keine unterschiedlichen Level zu den drei verschiedenen Zeitpunkten. Dies konnte auch in einer Untersuchung von Mäuseserum gezeigt werden [64]. Im Gegensatz dazu konnte in Kulturmedien aus Fibroblasten in zwei unterschiedlichen Studien eine rhythmische Oszillation derselben miR festgestellt werden [65, 71]. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf die verschiedenen Gewebe zurückzuführen. Eine andere Möglichkeit ist,

dass der Unterschied durch die Messung einerseits intrazellulärer miRs (Fibroblasten) und andererseits extrazelluläre miR (Serum) stattgefunden hat. Auch technische/präanalytische Abweichungen sind als Ursache denkbar. Letzteres wird im folgenden Beispiel beleuchtet: Selbst bei zwei vermeintlich gleichen Versuchsaufbauten [50, 78], die beide miRs in der Mausleber untersuchten, konnten nur minimale Übereinstimmungen in den Resultaten nachgewiesen werden [80]. Zu den möglichen Ursachen in diesem Fall zählen daher mutmaßliche Unterschiede in den technischen Abläufen, dem Probenmaterial und dessen Gewinnung, den analytischen Herangehensweisen und der Normalisierung [vgl 68, 77] und werden im Verlauf noch diskutiert (siehe Kapitel 5.4).

Im Bereich der Zirkadianik kann (wie bereits zu Beginn erwähnt) zwischen rhythmisch exprimierten miRs und der die Zirkadianik beeinflussenden miRs unterschieden werden. Ein Beispiel hierfür ist miR-17-5p, sie inhibiert das Clock-Gen, welches zur Produktion des Effektorproteins CLOCK führt. Dieses Protein wiederum fördert hingegen die Transkription von miR-17-5p (im Maus- oder Zellkultur-Experiment) [23]. Dies veranschaulicht die Komplexität der Feedback-Mechanismen und der gegenseitigen Regulation von miRs und den zirkadianen Genen und Proteinen. miR-17-5p konnte in der vorliegenden Analyse auch in bedeutsamer Menge nachgewiesen werden (hel). Mit dem Wissen von Goa et al, dass miR 17-5p Einfluss auf die Expression von CLOCK hat, könnte man eine tageszeitliche Expressionsveränderung von mirR-17-5p erwarten. Dies war in unserer Untersuchung jedoch nicht der Fall und unterstützt aber umso mehr die Relevanz unserer und weiterer zirkadianer Untersuchungen. Darüber hinaus ist auch hier aufgrund der unterschiedlichen Gewebe/Spezies ein direkter Transfer nicht möglich.

Eine weitere interessante Erkenntnis verschiedener Zirkadianik-Studien ist die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen oszillierenden Primärtranskripten (pri-/pre-miRs) und oszillierenden mature-miRs. Beispiel: Der mature-miR-122 konnten keine Schwankungen der Expression nachgewiesen werden [24, 35], jedoch gelang dies sowohl für die pri-miR, als auch für die pre-miR [24]. miR-122 spielt trotz des konstanten Expressionslevels der mature-miR eine wichtige Rolle in der rhythmischen Expression von Nocturnin, welches wiederum zur Kontrolle der zirkadianen Uhr beiträgt [24, 35]. miR-122 konnte auch in unserer Analyse sicher im Serum nachgewiesen werden und zeigte ebenfalls keine expliziten Veränderungen des Expressionsniveaus. Die Literatur berichtet aber, dass eine miR ohne tageszeitliche Oszillationen dennoch an der Zirkadianik beteiligt sein kann [81]. Ähnlich wie dies bei miR17-5p und CLOCK der Fall sein könnte.

An dieser Stelle sei nun die Schwierigkeit der Begriffe „Oszillation“ und „Fluktuation“ angemerkt. Problematisch erscheint in diesem Zusammenhang grundsätzlich das Fehlen einheitlicher Definitionen und Grenzwerte. Dalman berichtete bereits 2012, von deutlichen Unterschieden der Ergebnisse durch Nutzung verschiedener Methoden und damit zusammenhängend verschiedener cut-offs [15]. Wir teilen diesen Eindruck, um nur einige Beispiel zu nennen: Zum einen wird die Standardabweichung als Maß für die Differenzierung von Stabilität und Fluktuation genutzt [43], an anderer Stelle werden Western Blots [24] oder relative Expressionslevel verwendet, die in Prozent des Maximums angegeben werden [64]. Auch foldchange und statistische Tests werden genutzt. Die Aussagekraft bzw. die Signifikanzgrenzen des foldchange werden jedoch kontrovers diskutiert. Die ersten Microarrayanalyse nutzten alleinig den foldchange mit einem cut-off von ≥ 2 [44]. Hier wurde bemängelt, dass der foldchange alleine die Variabilität nicht berücksichtigen würde [44]. Im Verlauf entwickelten sich dann neue Ansätze, die foldchange und statistische Test in Kombination empfahlen.

In der vorliegenden Auswertung nutzten wir insbesondere den foldchange (fc). Zusätzlich verwendeten wir die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten (siehe Kapitel 3.9). Weder alleinig der fc, noch die Standardabweichung und/oder der Variationskoeffizient, stellen aus unserer Sicht eine optimale Bewertung der Expressionsschwankungen dar und sollten unserer Meinung nach weiterentwickelt werden, da Standardabweichung und Variationskoeffizient lediglich die Streubreite der Werte darstellen und der foldchange nur eine relative Veränderung zweier Werte im Vergleich angibt. Jedoch empfanden wir diese Kombination für unsere Zwecke in dieser deskriptiven Analyse mit kleinem Kollektiv als die beste Möglichkeit, da sie schnell und einfach nachvollzogen werden können.

5.2 Ernährung

Als Auslöser von Fluktuationen am Mittag kommt einerseits (die bereits beschriebene) „inneren physiologischen Rhythmik“ in Betracht. Andererseits könnten die Veränderungen, die sich hier insbesondere am Mittag präsentierten, in Zusammenhang mit der unmittelbar vorangegangenen Nahrungsaufnahme und/oder damit assoziierten metabolischen Prozessen gesetzt werden.

Dem Zusammenhang zwischen Ernährung, Nahrung und miRs wurde bisher eher wenig Beachtung in der Literatur geschenkt [29, 36, 49, 86]. Es wurde insbesondere in Hinsicht auf die hoffnungsvollen Biomarkerstudien des Blutes mehrfach kritisiert, dass weder der Untersuchungszeitpunkt noch die Tatsache, ob ein Patient/Proband nüchtern war,

berücksichtigt wurden [29, 36, 49]. Aus diesem Grund wurde bei unserer Studie insbesondere Wert auf den ersten Nüchternwert am Morgen als gut reproduzierbaren Ausgangswert gelegt.

Grundsätzlich festzuhalten gilt, dass Nahrung an sich auch miRs enthält [86]. Dazu kann die beinhaltete Menge von miRs je nach Zubereitung variieren. So ist der messbare Anteil von miRs in gekochtem Gemüse um ungefähr das 100fache im Vergleich zu ungekochtem Gemüse reduziert [91]. Infolgedessen sind verschiedene Formen der Einflussnahme denkbar [86]:

1. Ein direkter Einfluss von Nahrungsbestandteilen auf die endogene miR-Produktion.
2. Ein direkter Übertritt von exogenen, aus der Nahrung stammenden miRs (auch xenomiRs genannt) in die Blutzirkulation, die dann nicht mehr, oder nur sehr schwer von den endogenen miRs unterschieden werden können.
3. Ein direkter Einfluss von xenomiRs und deren Vehikeln auf die Konzentration von miRs-beinhaltenen Vehikeln (wie HDL).

Darüber hinaus konnte an Rattenlebern eine Veränderung der Expression einiger miRs durch Folsäuremangel gezeigt werden [16]. Es kam dabei zu einer verminderten Expression von miR-122 und zu gesteigerter Expression von Let-7a, miR-21, miR-23, miR-130, miR-190. In unserer Untersuchung konnten aus den eben genannten miRs miR-21-5p, miR-23a und b sowie miR-130b-3p in relevanter Menge (hel) nachgewiesen werden. Die suggestive Schlussfolgerung, dass auch bei unseren Probanden möglicherweise ein Folsäuremangel vorlag, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Unsere Probanden lieferten klinisch keinen Anhalt für einen Folsäuremangel (Folsäure war im Basislabor aber nicht bestimmt worden). Ein konkreter Vergleich ist aus unserer Sicht auch hier wegen der unterschiedlich untersuchten Gewebe und Spezies (Leber vs. Serum sowie Mensch vs. Ratte) nicht möglich. An anderer Stelle wurde beschrieben, dass die Produktion von miR-21 durch DHA (Docosahexaensäure, eine mehrfach ungesättigte Fettsäure) inhibiert wird [42]. Slattery et al berichtet über eine Assoziation zwischen Kohlehydrat- und Saccharosekonsum und dem miR-Expressionslevel, dies allerdings im Vergleich zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Kolonkarzinom [68]. Es finden sich also durchaus Hinweise, dass die Art der Ernährung sowie auch eine Mangel- oder Fehlernährung Einfluss auf endogene miRs hat. Aber auch der direkte Übertritt von xenomiRs in die Blutbahn sollte nicht außer Acht gelassen werden. Die genauen Mechanismen und unter welchen Bedingungen xenomiRs in

den Blutkreislauf gelangen und wie sie anschließend die endogene miR-Produktion sowie die Messung beeinflussen, ist aktueller Forschungsgegenstand. Darüber hinaus scheinen nicht alle mit der Nahrung aufgenommenen miRs in bedeutungsvoller Menge in die Blutzirkulation zu gelangen [86].

Neben der direkten Wirkung der Nahrung auf die miRs, sollten zudem die Auswirkungen des Ernährungszustandes des Körpers und die vorherrschenden Stoffwechselkonditionen betrachtet werden. So können beispielsweise erhöhte Lipoproteinanteile im Blut die Extraktion von miRs technisch erschweren [36] und könnten dadurch falsch-tiefe Expressionslevel durch ineffiziente Extraktionen vortäuschen. Zudem muss zwischen einer „akuten“ und einer „langfristigen“ Auswirkung differenziert werden. Ist der Fettanteil im Blut akut durch ein direkt voran gegangenes fettreiches Essen erhöht, oder liegt eine chronische/familiäre Hyperlipoproteinämie vor? Letzteres hätte Krankheitswert und wäre damit auch anders zu beurteilen. In diesem Kontext sei angemerkt, dass miRs von HDL im Blut transportiert werden und sich Unterschiede zwischen miR-Profilen aus HDL von Gesunden und von denjenigen mit familiärer Hypercholesterinämie nachweisen ließen [75]. Bei unseren Probanden konnte durch die initiale (nüchterne) Serumuntersuchung eine Hyperlipidämie mit Krankheitswert und somit eine Beeinflussung ausgeschlossen werden.

Witwer et al erläuterte, dass durch Krebserkrankungen im Besonderen, aber auch durch andere Krankheiten im Allgemeinen, die Ernährung verändert und somit auch der Ernährungszustand sowie die Stoffwechselkonditionen beeinflusst werden. Beispiele hierfür sind Kachexie, Wasting-Syndrom, Malassimilation, andere Formen der krankheitsbedingten Malnutrition oder schlicht fehlender Appetit. Hierdurch könnten in bereits durchgeführten Studien Expressionsveränderungen von miRs bei Kranken fälschlicherweise bestimmten Krankheiten zugeordnet worden sein, die letztendlich möglicherweise lediglich Ausdruck von zusätzlich existierender Mangelernährung sind [86] und somit aber keine krankheitsspezifischen Marker darstellen. Diese mögliche Fehlinterpretation von veränderten miRs-Expressionslevel durch häufig krankheitsbedingte Fehl-/Mangelernährung könnte zudem eine mögliche Erklärung sein, warum bei vielen verschiedenen Untersuchungen von unterschiedlichen Krankheiten oder Tumorentitäten es jeweils doch häufig Überschneidungen einzelner miRs gibt. Jarry et al [31] verglich beispielsweise im Zeitraum 2008-2013 154 miR-Signaturen im peripheren Blut (Serum und Plasma) von 16 unterschiedlichen Krebsarten. Manche miRs, insbesondere miR-21 trat dabei bei unterschiedlichen Tumorentitäten immer wieder hervor [31, 87]. Singh et al wies ebenfalls miR-21 in 6 verschiedenen Tumorarten verändert nach [67]. Darüber hinaus wurde miR-21

auch als Marker für Inflamationsprozesse in nicht kanzerogenen Krankheiten erwogen [31]. Die eben angesprochene miR-21, welche als Biomarker für Karzinome und oder als Inflamationsmarker gehalten wird [31, 67], war aber in der vorliegenden Analyse ebenfalls in bedeutsamer Menge nachweisbar und zählte darüber hinaus zu den 16 miRs mit der ausgeprägtesten Expression. Da miR-21-5p somit auch bei Gesunden in relevanten Mengen nachweisbar war, scheint es fraglich, ob und wie miR-21-5p als Marker für pathologische Prozesse genutzt werden kann. Möglicherweise muss hier eine absolute (Mengen-) Klassifizierung erfolgen, ab welchem Wert das Vorkommen von miR-21-5p als pathologisch gilt.

Die Komplexität, die Vielschichtigkeit und das Zusammenspiel von zirkadianer Rhythmik, tageszeitlich oszillierenden miRs und möglichen Auswirkungen von und auf Nahrungsaufnahme/-karenz wurde von Vodala et al am Beispiel der Drosophila und dem miR-959-964-Cluster herausgearbeitet [77]. Hier wurde einerseits ein zirkadianes Expressionsmuster des genannten Clusters beschrieben und zum anderen ein komplexer Feedback-Kreislauf gezeichnet, in dem die Menge an vorhandener miRs die Nahrungsaufnahme hemmt oder steigert [77] (Abbildung 15).

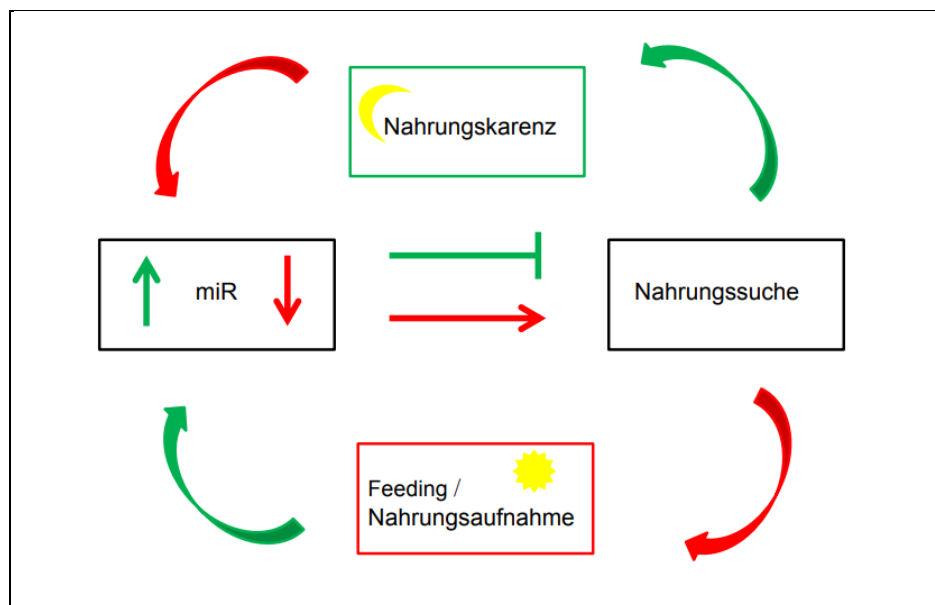


Abbildung 15: Interaktion von Zirkadianik und miRs (vereinfacht nach [77]): Am Morgen ist ein Tiefpunkt der Expressionslevel der miRs, dies führt zur Nahrungssuche und letztendlich zur Nahrungsaufnahme. Im Verlauf steigen dann die Expressionslevel der miRs wieder an. Die weitere Nahrungssuche wird gehemmt und es kommt zu einer (typischerweise nachts) Nahrungskarenz. Dadurch fallen die miR-Expressionslevel ab und der Kreislauf beginnt von vorne.

Zusammenfassend gibt es sowohl für die Hypothese der Beeinflussung durch die Nahrung, als auch für die Hypothese der inneren zirkadianen Rhythmik vielseitige Argumente. Eine Kombination beider Mechanismen ist unserer Ansicht nach hochwahrscheinlich. Aufgrund

unseres Versuchsaufbaus und der darin fehlenden nüchternen Vergleichsgruppe am Mittag, ist eine endgültige Interpretation unserer Ergebnisse nicht möglich. Weitere Analysen diesbezüglich erscheinen uns vielversprechend.

5.3 Physiologische Einflussfaktoren

Die Analysen der Funktionsweise von zirkulierenden miRs unter physiologischen Bedingungen stehen noch am Anfang [67] und es besteht weiter Forschungsbedarf für multiple physiologische Einflussfaktoren [17, 28, 29, 36]. Hierunter fallen unter Anderem das Alter [1, 9, 72], das Geschlecht [11, 17, 40] und die Ethnie [86].

Olivieri et al berichten von einem höheren Expressionslevel von miR-126-3p bei älteren Probanden [52] und suggerieren somit eine Veränderung der Expressionslage mit zunehmenden Alter. Ebenso wird dies durch Ameling beschrieben [1]. In unseren Untersuchungen gehörte miR 126-3p auch zu denjenigen miRs mit hohem Expressionslevel. Sie gehörte sogar zu den 16 miRs mit der stärksten Expression. Da unsere Probanden lediglich zu einem Zeitpunkt untersucht wurden, lässt sich über die Entwicklung im fortschreitenden Alter keine Aussage treffen. Bezüglich der Unterschiede zwischen den Geschlechtern gibt es verschiedene (bisher wenig übereinstimmende) Berichte. So konnte Duttagupta für einige humane miRs (miR 548-3p, miR-1323, miR-940, miR-1292) eine signifikante Erhöhung bei Frauen im Vergleich zu einer männlichen Kohorte zeigen [17]. Passend hierzu waren diese genannten 5 miRs in der vorliegenden Untersuchung (mit ausschließlich Männern) nicht oder in unbedeutender Menge nachweisbar. Auch Chen identifizierte 10 „Männer-miRs“ [11], unter dies fanden sich 5 miRs (miR-100-5p, miR-342-3p, miR-27b-3p, miR-423-3p sowie let-7c-5p), die auch in unserer Untersuchung in bedeutsamer Menge (hel-Gruppe) gemessen werden konnten. miR-222 war bei Chen et al ausschließlich im Serum der weiblichen Probandinnen zu finden [11], jedoch aber auch in unserer „Männer-Untersuchung“ in bedeutsamer Menge (hel). Ebenso in unserer hel-Gruppe waren die von Ameling beschriebenen „weiblichen miRs“ nachweisbar [1]. Potenzielle Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse werden im Verlauf noch diskutiert (siehe Kapitel 5.4). Diese vermuteten Geschlechtsdifferenzen könnten Grund, für die teils diskrepanten Ergebnisse aus Luxemburg (gemischtgeschlechtlich) und der vorliegenden Arbeit (rein männlich) sein.

Des Weiteren werden Beeinflussungen durch Sport, und Bewegung thematisiert. Mögliche Auswirkungen von Sport, wurde in einem Review von Aoi und Sakuma geschildert [2]. Hier zeigte sich beispielsweise eine Verminderung der Expression von miR-486 im Plasma, nach

einer 4-wöchigen Ausdauersportphase mit drei Radfahreinheiten pro Woche. Ursächlich wurde eine Sekretionshemmung aus dem Muskel durch den regelmäßigen Sport vermutet [2]. In unserer Analyse konnte miR-486 nicht in der Kategorie der bedeutsam exprimierten miRs nachgewiesen werden. Dies passt insofern zu der Erkenntnis von Aoi und Sakuma, dass die hier rekrutierten Probanden laut eigenen Angaben alle min. 2-3x/ Woche Ausdauer- und/oder Kraftsport treiben, dies auch schon seit längerer Zeit (> halbes Jahr) und somit eine stark verminderte Sekretion aus dem Muskel denkbar wäre. In diesem Zusammenhang ist aus unserer Sicht zudem eine Beeinflussung durch den (reduzierten) Körperfettanteil denkbar.

Weiter werden exogene Einflüsse wie Nikotin oder Medikamente diskutiert. Bei Rauchern war beispielsweise miR-29b signifikant vermindert während miR-223-3p signifikant erhöht war [4]. Kongruent hierzu konnte in unserer Untersuchung mit ausschließlich Nichtrauchern miR-29b nachgewiesen werden, wohingegen miR 223-3p nicht in bedeutsamer Menge messbar war.

DeBoer et al zeigte beispielsweise, dass die Aspirin-Einnahme die miR-126-Level im Plasma reduzieren kann [8]. Hierzu passend konnte bei den hiesigen Probanden (die kein Aspirin einnahmen) miR-126 im Serum in bedeutsamer Menge gemessen werden. Diese mutmaßlichen Einflüsse durch Medikamente scheinen jedoch insbesondere in Bezug auf die bisherigen Biomarkerstudien wichtig, da diese Patienten häufig unter aktueller oder vorausgegangener Medikation (z.B Chemotherapie oder Analgetika) stehen [72].

Zusammenfassend gibt es also eine Vielzahl an physiologischen Variablen, die die Expressionslevel von miRs auf unterschiedlichste Weisen zu beeinflussen scheinen.

5.4 Technische und methodische Herausforderungen

Um fundierte Ergebnisse bezüglich der physiologischen Verhältnisse reproduzieren zu können, gibt es vorher noch eine grundlegende Herausforderung, die in der Etablierung eines einheitlichen Prozedere in allen technischen und methodischen Schritten besteht. Dies ist einer der größten und schwerwiegendsten Kritikpunkte des gesamten miR-Themen-Komplexes. Denn die anfängliche Euphorie, die mit den miRs aufkam, wurde zwischenzeitlich von vielen kritischen Stimmen abgeschwächt. In großen Biomarker-Reviews wurde über mangelnde Übereinstimmung (wie bereits oben auch beschreiben), fehlende standardisierte Protokolle und daraus resultierend nahezu unmögliche Vergleichbarkeit und Interpretation berichtet [12, 14, 28, 31, 38, 67, 87]. Inhomogenität fand sich hier auf

verschiedenen Ebenen. Beeinflussungen sind schon bei der Blutentnahme und der Wahl der Punktionskanüle möglich. Hier hat möglicherweise die Nadelgröße einen Einfluss auf das endgültige Ergebnis [36]. Eine weitere Variable stellt die Wahl des Blutentnahmeröhrchen dar; Serum +/- Gel oder Plasma [36]. Auch die verschiedenen Antikoagulanzen können eine Rolle spielen [36, 45, 47, 49]. Im Plasma scheint zwar die miR-Konzentration höher, allerdings ist dies wahrscheinlich durch eine Kontamination mit Thrombozyten hervorgerufen, weshalb McDonald et al sich eher für Serum als Probenmaterial aussprach [45]. An anderer Stelle wird betont, dass keine generelle Empfehlung bezüglich Plasma oder Serum abgegeben werden kann [13]. Generell würden Plasma und Serum etwa gleichhäufig in Analysen verwendet werden [31]. Aufgrund von klinischer Praktikabilität, und der höheren Wahrscheinlichkeit der Kontamination bei Plasma, haben wir uns für die Verwendung von Serum entschieden.

Nach der Blutentnahme besteht das weitere Prozedere aus RNA-Extraktion/Isolation, möglichen Zentrifugationen und Preamplifikation, gefolgt von der eigentlichen Messung der miR-Menge und der anschließenden Normalisierung, Auswertung und Interpretation (vergleiche Kapitel 3.3-3.9). Für jeden dieser Schritte sind verschiedene Techniken und verschiedene Kits unterschiedlicher Hersteller verfügbar [31, 36, 76]. Mit den jeweiligen Vor- und Nachteile der verschiedenen Techniken, sowie den technisch und methodischen Herausforderungen haben sich einige Arbeitsgruppen auseinandergesetzt und in verschiedenen Reviews zusammengefasst [31, 36, 45, 49, 61, 76]. Wir entschieden uns für die Methodik der qPCR, die aktuell als Goldstandard gilt [76] und zudem am häufigsten genutzt wird [12]. Im Gegensatz zu Hybridisierungs-Arrays, ist bei der qPCR keine Validierung erforderlich und somit ist eine quantitative Aussage möglich.

Diese technischen Unterschiede verdeutlichen sich durch nicht reproduzierbare oder sich widersprechende Ergebnisse. Margue et al widmeten sich der Suche nach Biomarkern für das Melanom und verglichen ihre eigenen Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen und stellten fest (wie auch die oben genannten Reviews), dass mit einigen Arbeitsgruppen gar keine Übereinstimmung oder gar konträre Ergebnisse zu finden waren. Margue et al führten dies auf die unterschiedlichen Methoden und Plattformen die genutzt wurden zurück [43]. Slattery et al kam mit ihren Ergebnissen im Vergleich mit ähnlichen Analysen zum gleichen Schluss, dass keinerlei Ergebnisse reproduzierbar waren, beziehungsweise sich gegensätzliche Ergebnisse präsentierten [68].

Eine andere Einschränkung der Aussagekraft der verschiedenen Analysen besteht in der generellen Problematik des häufig stark eingeschränkten Stichprobenumfangs [84]. Chen et

al rekrutierte für die Analyse der Geschlechterdifferenz vier Männer und drei Frauen [11]. Arroyo et al [3] nutzte eine Kohorte von drei Personen, McDonald et al [45] rekrutierte zehn Probanden. Auch Keller et al [32] fundiert seine Aussage, dass es keine zirkadiane Rhythmik gebe, auf der Analyse einer Probe einer einzelnen Person. Diese Einschränkung besteht auch bei unserer Untersuchung (pro Zeitpunkt jeweils sechs Messwerte, von vier verschiedenen Probanden). Dennoch fanden sich Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Margue und wie bereits zuvor beschrieben auch mit anderen Untersuchungen, die vielversprechend und Anreiz für weitere Analysen sind.

5.5 Abschließendes Statement/Schlussfolgerung

Nach dieser Untersuchung von zirkulierenden miRs lassen sich folgende Dinge festhalten. Eine generelle, das gesamte miRnome betreffende zirkadiane Rhythmik ließ sich nicht zeigen. Jedoch konnten für einzelne miRs unterschiedliche Expressionslevel im Tagesverlauf nachgewiesen werden. Zentrale aussichtsvolle Hypothesen sind die Beeinflussung durch Nahrungsaufnahme und/oder durch die Tageszeit. Eine endgültige Differenzierung und Interpretation sind auf Grundlage dieser Arbeit alleine jedoch nicht möglich. Für beide Varianten existieren vielversprechende Hinweise. Darüber hinaus gibt es einige Anhaltspunkte, dass sowohl Geschlecht und Alter als auch Sport und Bewegung Einflussfaktoren sind.

6 Abkürzungen

ab	abends
Abb	Abbildung
AGO	Argonaute-Proteine
cDNA	komplementäre DNS
CK	Kreatinkinase
CRP	c-reaktives Protein
Ct	Cycle of theshold
fc1	foldchange zwischen morgens und mittags
fc2	foldchange zwischen morgens und abends
ges	gesamt
gGT	gamma-Glutamyltransferase
GOT	Glutamat-Oxalacetattransferase
GPT	Glutamat-Pyruvattransferase
has	homo sapiens
HDL	High-Density-Lipoprotein-Cholesterin
hel	high expression level
HOM	Homburg
LDH	Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin
LUX	Luxemburg
mi	mittags
miR	microRNA
miRNA	microRNA
miRs	microRNAs
mo	morgens
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
nt	Nucleotide
PACT	protein kinasae R-activating protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribunucleinsäuren
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	rotation per minute

SD	Standardabweichung
Tab	Tabelle
TLR87	Toll-Like-Rezeptoren
TRBP	transactivation-response RNA-Binding protein
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
UTR	untranslated region
VC	Variationskoeffizient
Vol1	Proband 1, erste Woche
Vol2	Proband 2, erste Woche
Vol2/2	Proband 2, zweite Woche
Vol3	Proband 3, erste Woche
Vol4	Proband 4, erste Woche
Vol4/2	Proband 4, zweite Woche

7 Abbildungs- und Diagrammverzeichnis

Abbildung 1: Biogenese der miRs nach [40]:.....	9
Abbildung 2: Möglichkeiten der interzellulären Kommunikation von miRs nach [12].....	12
Abbildung 3: Bestimmung von Threshold und Cycle threshold (Ct) [58]..	24
Abbildung 4: Gesamtverteilung aller Ct-Werte aller Probanden	27
Abbildung 5: durchschnittliche Anzahl analysierter miRs pro Proband.....	30
Abbildung 6: Übersicht der miRs der Kategorie high expression level:.....	32
Abbildung 7: Zeitverlauf der Ct-Werte von miR-320b	34
Abbildung 8: Zeitverlauf der Ct-Werte von miR-375 und miR-143-3p	35
Abbildung 9: Zeitverlauf der Ct-Werte von miR-365-3p	36
Abbildung 10: Zeitverläufe der Ct-Werte von miR-1183, miR-92b und miR-1207-5p.....	37
Abbildung 11: Zeitverläufe der Ct-Werte von miR-628-3p und miR-637.	38
Abbildung 12: Zeitverlauf der Ct-Werte von miR-144-3p	38
Abbildung 13: Zeitverläufe der Ct-Werte von miR-1289-5p und miR-133b..	39
Abbildung 14: Vergleich zwischen Homburg und Luxemburg..	41
Abbildung 15: Interaktion von Zirkadianik und miRs (vereinfacht nach [77]).....	48

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probandeneigenschaften	16
Tabelle 2: Zyklusbedingungen für 384-plex preamplification (aus „miScript preAMP Handbook August2012“, von Qiagen [57]).....	21
Tabelle 3: Zyklusbedingungen real-time PCR QC PreAMP („miScript preAMP Handbook August2012“, von Qiagen [57]).....	22
Tabelle 4: Zyklusbedingungen real-time PCR (aus „miScript miRNA PCR Array Handbook Mai 2012“, von Qiagen, [58])	23
Tabelle 5: Statistische Tests zur Normalverteilung der Gesamtverteilung der Werte $Ct < 30$ [nach 30]	28
Tabelle 6: Deskriptive Statistik ohne $Ct \geq 30$	28
Tabelle 7: Statistische Tests zur Normalverteilung hel [nach 30]	30
Tabelle 8: Deskriptive Statistik hel	31
Tabelle 9: miRs mit kleinsten Mittelwerten.....	33
Tabelle 10: 10 miRs mit konstantem Expressionslevel.....	33
Tabelle 11: Vergleich der Ct-Werte $> \geq 30$ zwischen Woche 1 und Woche 2	39
Tabelle 12: Vergleich zwischen Woche 1 und 2 von Proband 2 und 4.....	40

9 Literaturverzeichnis

1. Ameling S, Kacprowski T, Chilukoti RK et al (2015) Associations of circulating plasma microRNAs with age, body mass index and sex in a population-based study. *BMC Med Genomics* 8:1–9. doi: 10.1186/s12920-015-0136-7
2. Aoi W, Sakuma K (2014) Does regulation of skeletal muscle function involve circulating microRNAs? *Frontiers Physiol* 5:1–8. doi: 10.3389/fphys.2014.00039
3. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM et al (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5003–8. doi: 10.1073/pnas.1019055108
4. Badrnya S, Baumgartner R, Assinger A (2014) Smoking alters circulating plasma microvesicle pattern and microRNA signatures. *Thromb Haemost* 112:128–136. doi: 10.1160/TH13-11-0977
5. Beermann J, Piccoli M-T, Viereck J et al (2016) Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol Rev* 96:1297–325. doi: 10.1152/physrev.00041.2015
6. Behrmann I, Margue C, Kreis S (2015) Circulating microRNAs as Candidate Biomarkers for the Surveillance of Melanoma Patients. *EBioMedicine* 2:625–626. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.07.015
7. Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A et al (2013) Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 59:164–169. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.09.015
8. Boer HC De, Solingen C Van, Prins J et al (2013) Aspirin treatment hampers the use of plasma microRNA-126 as a biomarker for the progression of vascular disease. *Eur Heart J* 34:3451–3457. doi: 10.1093/eurheartj/eht007
9. Bonafè M, Olivieri F (2015) Circulating microRNAs in aging. *Oncotarget* 6:1340–1341. doi: 10.18632/oncotarget.3175
10. Boon RA, Vickers KC (2013) Intercellular transport of MicroRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:186–192. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300139
11. Chen X, Ba Y, Ma L et al (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997–1006. doi: 10.1038/cr.2008.282
12. Cheng G (2015) Circulating miRNAs: Roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 81:75–93. doi: 10.1016/j.addr.2014.09.001
13. Cheng HH, Yi HS, Kim Y et al (2013) Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels. *PLoS One* 8:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0064795
14. Cortez MA, Bueso-ramos C, Ferdin J et al (2012) MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 8:467–477. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.76.
15. Dalman MR, Deeter A, Nimishakavi G, Duan Z-H (2012) Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. *BMC Bioinformatics* 13:S11. doi: 10.1186/1471-2105-13-S2-S11
16. Davis CD, Ross SA (2008) Evidence for dietary regulation of microRNA expression in cancer cells. *Nutr Rev* 66:477–482. doi: 10.1111/j.1753-4887.2008.00080.x
17. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J et al (2011) Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0020769

18. Eichele G, Oster H (2008) Chronobiologie: das genetische Netzwerk der zirkadianen Uhr koordiniert die Wechselwirkung zwischen Lebewesen und Umwelt. http://www.mpibpc.mpg.de/327366/research_report_318255?c=15144. Zugegriffen: 23.08.2019, 21:40Uhr
19. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E (2008) Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell* 132:9–14. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.024
20. Fabbri M, Paone A, Calore F et al (2012) MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. doi: 10.1073/pnas.1209414109/-/DCSupplemental. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1209414109
21. Flores O, Kennedy EM, Skalsky RL, Cullen BR (2014) Differential RISC association of endogenous human microRNAs predicts their inhibitory potential. *Nucleic Acids Res* 42:4629–4639. doi: 10.1093/nar/gkt1393
22. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92–105. doi: 10.1101/gr.082701.108
23. Gao Q, Zhou L, Yang S-Y, Cao J-M (2016) A novel role of microRNA 17-5p in the modulation of circadian rhythm. *Sci Rep* 6:30070. doi: 10.1038/srep30070
24. Gatfield D, Martelot G Le, Vejnar CE et al (2009) Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev* 23:1313–1326. doi: 10.1101/gad.1781009.
25. German Conference for Laboratory Medicine (DKLM) (2016) Congress of Clinical Chemistry and Laboratory. *Clin Chem Lab Med* 54:367–473. doi: 10.1515/cclm-2016-0723
26. Ha M, Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:509–524. doi: 10.1038/nrm3838
27. Hammond SM (2015) An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 87:3–14. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.001
28. He Y, Lin J, Kong D et al (2015) Current state of circulating microRNAs as cancer biomarkers. *Clin Chem* 61:1138–1155. doi: 10.1373/clinchem.2015.241190
29. Healy NA, Heneghan HM, Miller N et al (2012) Systemic mirnas as potential biomarkers for malignancy. *Int J Cancer* 131:2215–2222. doi: 10.1002/ijc.27642
30. Hemmerich W (2019) Normalverteilung online prüfen: StatistikGuru. <https://statistikguru.de/rechner/normalverteilung-rechner.html>. Zugegriffen: 26.06.2019, 13:20Uhr
31. Jarry J, Schadendorf D, Greenwood C et al (2014) The validity of circulating microRNAs in oncology: Five years of challenges and contradictions. *Mol Oncol* 8:819–829. doi: 10.1016/j.molonc.2014.02.009
32. Keller A, Leidinger P, Bauer A et al (2011) Toward the blood-borne miRNome of human diseases. *Nat Methods* 8:841–843. doi: 10.1038/nmeth.1682
33. Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ et al (2011) Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0024145
34. Köberle V, Pleli T, Schmithals C et al (2013) Differential Stability of Cell-Free Circulating microRNAs: Implications for Their Utilization as Biomarkers. *PLoS One* 8:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0075184
35. Kojima S, Gatfield D, Esau CC, Green CB (2010) MicroRNA-122 modulates the rhythmic expression profile of the circadian deadenylase Nocturnin in mouse liver. *PLoS One* 5:1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0011264

36. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M (2010) Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 50:298–301. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.032
37. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM et al (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 141:672–675. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x
38. Leidner RS, Li L, Thompson CL (2013) Dampening Enthusiasm for Circulating MicroRNA in Breast Cancer. *PLoS One* 8:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0057841
39. Li L, Zhu D, Huang L et al (2012) Argonaute 2 Complexes Selectively Protect the Circulating MicroRNAs in Cell-Secreted Microvesicles. *PLoS One* 7:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0046957
40. Link JC, Hasin-Brumshtein Y, Cantor RM et al (2017) Diet, gonadal sex, and sex chromosome complement influence white adipose tissue miRNA expression. *BMC Genomics* 18:89. doi: 10.1186/s12864-017-3484-1
41. Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D et al (2016) Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem* 51:1–17. doi: 10.1016/j.proghi.2016.06.001
42. Mandal CC, Ghosh-Choudhury T, Dey N et al (2012) miR-21 is targeted by omega-3 polyunsaturated fatty acid to regulate breast tumor CSF-1 expression. *Carcinogenesis* 33:1897–1908. doi: 10.1093/carcin/bgs198
43. Margue C, Reinsbach S, Philippidou D et al (2015) Comparison of a healthy miRNome with melanoma patient miRNomes: are microRNAs suitable serum biomarkers for cancer? *Oncotarget* 6:12110–12127. doi: 10.18632/oncotarget.3661
44. McCarthy DJ, Smyth GK (2009) Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics* 25:765–771. doi: 10.1093/bioinformatics/btp053
45. McDonald JS, Milosevic D, Reddi H V. et al (2011) Analysis of circulating microRNA: Preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem* 57:833–840. doi: 10.1373/clinchem.2010.157198
46. Mehta N, Cheng HYM (2013) Micro-managing the circadian clock: The role of microRNAs in biological timekeeping. *J Mol Biol* 425:3609–3624. doi: 10.1016/j.jmb.2012.10.022
47. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM et al (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10513–8. doi: 10.1073/pnas.0804549105
48. Mohr AM, Mott JL (2015) Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis* 35:3–11. doi: 10.1055/s-0034-1397344
49. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J et al (2014) Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med* 18:371–390. doi: 10.1111/jcmm.12236
50. Na Y-J, Sung JH, Lee SC et al (2009) Comprehensive analysis of microRNA-mRNA co-expression in circadian rhythm. *Exp Mol Med* 41:638–647. doi: 10.3858/emm.2009.41.9.070
51. Nagel R, Clijsters L, Agami R (2009) The miRNA-192/194 cluster regulates the Period gene family and the circadian clock. *FEBS J* 276:5447–5455. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07229.x
52. Olivieri F, Bonafè M, Spazzafumo L et al (2014) Age- and glycemia-related miR-126-3p levels in plasma and endothelial cells. *Aging (Albany NY)* 6:771–787. doi: 10.18632/aging.100693
53. Philippidou D, Schmitt M, Moser D et al (2010) Signatures of MicroRNAs and selected MicroRNA target genes in human melanoma. *Cancer Res* 70:4163–4173. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4512

54. Price C, Chen J (2014) MicroRNAs in Cancer Biology and Therapy: Current Status and Perspectives. *Genes Dev* 1:53–63. doi: 10.1016/j.gendis.2014.06.004.
55. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M et al (2012) MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* 13:358–369. doi: 10.1038/nrg3198.MicroRNA
56. Qiagen (2011) miScript PCR System Handbook. Protocol 1–56.
57. Qiagen (2012) miRNeasy Serum / Plasma Handbook. In: Protocol. S 1–44
58. Qiagen (2012) miScript® PreAMP Handbook. Protocol 1–52.
59. Qiagen (2012) miScript® miRNA PCR Array Handbook. Protocol 1–60.
60. Qiagen (2019) website Datenanalyse. <https://www.qiagen.com/at/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>. Zugegriffen:14.05.2019, 12:20Uhr
61. Van Rooij E (2011) The art of MicroRNA research. *Circ Res* 108:219–234. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227496
62. Sabiosciences (2018) webbasierte Datenanalyse. <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>. Zugegriffen: zuletzt ca 2017, website nicht mehr aktuell, neu website über Qiagen siehe [60]
63. Shaffer J, Schlumpberger M, Lader E (2012) miRNA profiling from blood — challenges and recommendations. Qiagen 1–10.
64. Shende VR, Goldrick MM, Ramani S, Earnest DJ (2011) Expression and rhythmic modulation of circulating micromRNAs targeting the clock gene *Bmal1* in mice. *PLoS One* 6:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0022586
65. Shende VR, Kim SM, Neuendorff N, Earnest DJ (2014) MicroRNAs function as cis- and trans-acting modulators of peripheral circadian clocks. *FEBS Lett* 588:3015–3022. doi: 10.1016/j.febslet.2014.05.058
66. Shi L, Ko ML, Ko GYP (2009) Rhythmic expression of microRNA-26a regulates the L-type voltage-gated calcium channel α_1C subunit in chicken cone photoreceptors. *J Biol Chem* 284:25791–25803. doi: 10.1074/jbc.M109.033993
67. Singh R, Ramasubramanian B, Kanji S et al (2016) Circulating microRNAs in cancer: Hope or hype? *Cancer Lett* 381:113–121. doi: 10.1016/j.canlet.2016.07.002
68. Slattery ML, Herrick JS, Mullany LE et al (2017) Diet and lifestyle factors associated with miRNA expression in colorectal tissue. *Pharmgenomics Pers Med* 10:1–16. doi: 10.2147/PGPM.S117796
69. Stark MS, Bonazzi VF, Boyle GM et al (2015) miR-514a regulates the tumour suppressor NF1 and modulates BRAF sensitivity in melanoma. *Oncotarget* 6:17753–63. doi: 10.18632/oncotarget.3924
70. Swarts DC, Makarova K, Wang Y et al (2014) The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat Struct Mol Biol* 21:743–753. doi: 10.1038/nsmb.2879
71. Tan X, Zhang P, Zhou L et al (2012) Clock-controlled mir-142-3p can target its activator, *Bmal1*. *BMC Mol Biol* 13:27. doi: 10.1186/1471-2199-13-27
72. Tiberio P, Callari M, Angeloni V et al (2015) Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers. *Biomed Res Int* 2015:1–10. doi: 10.1155/2015/731479
73. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 39:7223–7233. doi: 10.1093/nar/gkr254

74. Valadi H, Ekström K, Bossios A et al (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654–659. doi: 10.1038/ncb1596
75. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM et al (2011) MicroRNAs are Transported in Plasma and Delivered to Recipient Cells by High-Density Lipoproteins. *13*:423–433. doi: 10.1038/ncb2210.MicroRNAs
76. Vigneron N, Meryet-Figui Ere M, Guttin A et al (2016) Towards a new standardized method for circulating miRNAs profiling in clinical studies: Interest of the exogenous normalization to improve miRNA signature accuracy. *Mol Oncol* 1–12. doi: 10.1016/j.molonc.2016.03.005
77. Vodala S, Pescatore S, Rodriguez J et al (2012) The oscillating miRNA 959-964 cluster impacts *Drosophila* feeding time and other circadian outputs. *Cell Metab* 16:601–612. doi: 10.1016/j.cmet.2012.10.002
78. Vollmers C, Schmitz RJ, Nathanson J et al (2012) Circadian oscillations of protein-coding and regulatory RNAs in a highly dynamic mammalian liver epigenome. *Cell Metab* 16:833–845. doi: 10.1016/j.cmet.2012.11.004
79. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Young Y (2010) MicroRNAs : Synthesis , mechanism , function , and recent clinical trials. *BBA - Mol Cell Res* 1803:1231–1243. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.06.013
80. Wang G-K, Zhu J-Q, Zhang J-T et al (2010) Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 31:659–66. doi: 10.1093/eurheartj/ehq013
81. Wang H, Fan Z, Zhao M et al (2016) Oscillating primary transcripts harbor miRNAs with circadian functions. *Sci Rep* 6:21598. doi: 10.1038/srep21598
82. Wang K, Zhang S, Weber J et al (2010) Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 38:7248–7259. doi: 10.1093/nar/gkq601
83. Weber JA, Baxter DH, Zhang S et al (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56:1733–1741. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405
84. Weiland M, Gao X-H, Zhou L, Mi Q-S (2012) Small RNAs have a large impact: Circulating microRNAs as biomarkers for human diseases. *RNA Biol* 9:850–859. doi: 10.4161/rna.20378
85. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA et al (2015) Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian MicroRNA biogenesis. *Mol Cell* 57:397–408. doi: 10.1016/j.molcel.2014.11.030
86. Witwer KW (2012) XenomiRs and miRNA homeostasis in health and disease: evidence that diet and dietary miRNAs directly and indirectly influence circulating miRNA profiles. *RNA Biol* 9:1147–54. doi: 10.4161/rna.21619
87. Wu K, Li L, Li S (2015) Circulating microRNA-21 as a biomarker for the detection of various carcinomas : an updated meta-analysis based on 36 studies. *Tumor Biol* 36:1973–1981. doi: 10.1007/s13277-014-2803-2
88. Wu S, Fesler A, Ju J (2016) Implications of Circadian Rhythm Regulation by microRNAs in Colorectal Cancer. *Cancer Transl Med* 2:1–6. doi: 10.4103/2395-3977.177555
89. Yang M, Lee J-E, Padgett RW, Edery I (2008) Circadian regulation of a limited set of conserved microRNAs in *Drosophila*. *BMC Genomics* 9:83. doi: 10.1186/1471-2164-9-83
90. Zhang J, Li S, Li L et al (2015) Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics Bioinforma* 13:17–24. doi: 10.1016/j.gpb.2015.02.001
91. Zhang L, Hou D, Chen X et al (2012) Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res* 22:107–26. doi:

10.1038/cr.2011.158

92. mirbase.org. http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa. Zugegriffen: 23.08.2019, 21:41Uhr

10 Anhang

10.1 Liste der miRs aus hel-Gruppe

1-A01	hsa-miR-346
1-A04	hsa-miR-223-3p
1-A11	hsa-miR-194-5p
1-A18	hsa-miR-375
1-A21	hsa-miR-106b-5p
1-B03	hsa-miR-130a-3p
1-B04	hsa-miR-652-3p
1-B06	hsa-miR-192-5p
1-B07	hsa-miR-30c-5p
1-B10	hsa-miR-29c-3p
1-B14	hsa-let-7i-5p
1-B15	hsa-miR-628-3p
1-B17	hsa-miR-92a-3p
1-B18	hsa-miR-126-3p
1-B20	hsa-miR-30b-5p
1-B23	hsa-miR-340-5p
1-B24	hsa-miR-15b-5p
1-C04	hsa-miR-93-5p
1-C11	hsa-miR-15a-5p
1-C20	hsa-miR-324-5p
1-D01	hsa-miR-29a-3p
1-D02	hsa-miR-26b-5p
1-D03	hsa-let-7a-5p
1-D05	hsa-let-7g-5p
1-D06	hsa-miR-25-3p
1-D07	hsa-miR-532-5p
1-D10	hsa-miR-144-3p
1-D12	hsa-miR-425-5p
1-D15	hsa-miR-505-3p
1-D17	hsa-miR-744-5p
1-D18	hsa-miR-26a-5p
1-E06	hsa-miR-24-3p
1-E10	hsa-miR-615-3p
1-E11	hsa-miR-18a-5p
1-E12	hsa-miR-222-3p
1-E14	hsa-miR-125b-5p
1-E15	hsa-miR-365b-3p
1-E18	hsa-miR-660-5p

1-E19	hsa-miR-148b-3p
1-E20	hsa-let-7c-5p
1-F01	hsa-miR-185-5p
1-F11	hsa-miR-148a-3p
1-F16	hsa-miR-484
1-F19	hsa-miR-423-3p
1-F22	hsa-miR-424-5p
1-G02	hsa-miR-486-5p
1-G04	hsa-miR-125a-5p
1-G05	hsa-miR-20b-5p
1-G10	hsa-miR-186-5p
1-G12	hsa-miR-146b-5p
1-G14	hsa-miR-23b-3p
1-G19	hsa-miR-152-3p
1-G20	hsa-miR-22-3p
1-G23	hsa-miR-361-5p
1-H01	hsa-miR-23a-3p
1-H05	hsa-miR-19b-3p
1-H08	hsa-miR-103a-3p
1-H12	hsa-miR-142-3p
1-H23	hsa-let-7f-5p
1-I02	hsa-miR-122-5p
1-I10	hsa-miR-133b
1-I11	hsa-miR-143-3p
1-I12	hsa-miR-766-3p
1-I14	hsa-miR-142-5p
1-I16	hsa-miR-19a-3p
1-I19	hsa-miR-130b-3p
1-I20	hsa-miR-128-3p
1-J06	hsa-miR-27a-3p
1-J07	hsa-miR-320a
1-J09	hsa-miR-591
1-J10	hsa-miR-16-5p
1-J11	hsa-miR-100-5p
1-J14	hsa-let-7e-5p
1-J24	hsa-miR-27b-3p
1-K01	hsa-miR-637
1-K03	hsa-miR-195-5p

1-K08	hsa-miR-342-3p
1-K13	hsa-miR-140-3p
1-K19	hsa-miR-378a-3p
1-K20	hsa-miR-139-5p
1-L04	hsa-miR-99a-5p
1-L07	hsa-miR-197-3p
1-L09	hsa-let-7b-5p
1-L11	hsa-miR-181b-5p
1-L14	hsa-miR-7-5p
1-L16	hsa-miR-489-3p
1-L17	hsa-miR-20a-5p
1-L21	hsa-miR-101-3p
1-M03	hsa-miR-345-5p
1-M05	hsa-miR-21-5p
1-M08	hsa-miR-193a-5p
1-M14	hsa-miR-191-5p
1-M15	hsa-miR-532-3p
1-M20	hsa-miR-30d-5p
1-M22	hsa-miR-30a-5p
1-M24	hsa-miR-151a-3p
1-N09	hsa-miR-29b-3p
1-N13	hsa-let-7d-5p
1-O02	hsa-miR-146a-5p
1-O03	hsa-miR-150-5p
1-O07	hsa-miR-30e-5p
1-O08	hsa-miR-151a-5p
1-O11	hsa-let-7d-3p
1-O21	hsa-miR-126-5p
1-P03	hsa-miR-145-5p
1-P10	hsa-miR-199a-5p
2-A09	hsa-miR-22-5p
2-A10	hsa-miR-221-3p
2-A11	hsa-miR-224-5p
2-B01	hsa-miR-30e-3p
2-B03	hsa-miR-324-3p
2-B04	hsa-miR-326
2-B05	hsa-miR-328-3p
2-B08	hsa-miR-1307-3p

2-B12	hsa-miR-409-3p
2-B16	hsa-miR-425-3p
2-B18	hsa-miR-451a
2-B19	hsa-miR-483-3p
2-B21	hsa-miR-490-3p
2-C07	hsa-miR-99b-5p
2-C24	hsa-miR-320b
2-D08	hsa-miR-373-5p
2-D13	hsa-miR-432-3p
2-E03	hsa-miR-423-5p
2-E11	hsa-miR-574-3p
2-E17	hsa-miR-1280
2-E18	hsa-miR-1281
2-F01	hsa-miR-1287-5p
2-F08	hsa-miR-1290
2-F14	hsa-miR-1183
2-F22	hsa-miR-1207-5p
2-H12	hsa-miR-675-3p

2-H13	hsa-miR-720
2-I01	hsa-miR-92b-5p
2-I05	hsa-miR-1296-5p
2-I08	hsa-miR-1298-5p
2-I17	hsa-miR-1233-3p
2-I19	hsa-miR-1237-3p
2-I20	hsa-miR-1238-3p
2-J01	hsa-miR-1247-5p
2-J07	hsa-miR-144-5p
2-J09	hsa-miR-1471
2-J18	hsa-miR-195-3p
2-J23	hsa-miR-223-5p
2-K19	hsa-miR-596
2-L11	hsa-miR-7-2-3p
2-L12	hsa-miR-1825
2-L19	hsa-miR-1260a
2-N08	hsa-miR-3131
2-O14	hsa-miR-874-3p

2-O22	hsa-miR-1976
2-O23	hsa-miR-4274
3-A06	hsa-miR-3173-3p
3-C01	hsa-miR-1260b
3-D07	hsa-miR-16-2-3p
3-D16	hsa-miR-3907
3-E14	hsa-miR-4291
3-F08	hsa-miR-3200-5p
3-G21	hsa-miR-4286
3-H09	hsa-miR-4301
3-J08	hsa-miR-92b-3p
3-K07	hsa-miR-3176
3-L03	hsa-miR-877-3p
3-N03	hsa-miR-17-5p
3-N04	hsa-miR-199b-3p
3-N05	hsa-miR-374c-5p

10.2 Rohwerte der Qualitätskontrollen

Vol1			
plate1	mo	mi	ab
cel-miR-39	16,85	16,96	16,43
cel-miR-39	16,49	17,01	16,55
SNORD61	29,9	31,15	29,26
SNORD68	31,1	32,52	30,84
SNORD72	N/A	N/A	N/A
SNORD95	25,48	26,17	25,48
SNORD96A	30,99	31,26	30,4
RNU6-2	30,66	31,02	29,93
miRTC	16,63	17,07	17,03
miRTC	16,63	17,2	17,17
PPC	19,23	19,58	19,19
PPC	19,55	19,54	19,53
plate2			
cel-miR-39	17,08	17,17	16,68
cel-miR-39	16,54	16,9	16,25
SNORD61	30,03	32,39	29,65
SNORD68	31,08	31,91	30,37
SNORD72	N/A	N/A	N/A
SNORD95	25,45	26,28	25,41
SNORD96A	30,24	30,12	30
RNU6-2	31,02	31,2	30,28
miRTC	16,72	17,35	16,67
miRTC	17,19	17,31	17,11
PPC	19,48	19,31	19,42
PPC	18,9	19,23	19,15
plate3			
cel-miR-39	16,86	16,88	16,48
cel-miR-39	16,66	16,61	16,42
SNORD61	30,76	30,45	30,85
SNORD68	31,35	32,33	30,07
SNORD72	N/A	N/A	N/A
SNORD95	25,35	25,74	25,33
SNORD96A	30,7	31,31	30,31
RNU6-2	30,14	30,46	30,72
miRTC	16,67	17,03	16,76
miRTC	17,08	17,06	17,11
PPC	19,32	19,34	19,37
PPC	19,86	19,79	19,55

	Vol2/1			Vol2/2		
plate1	mo	mi	ab	mo	mi	ab
cel-miR-39	16,21	17,13	17,01	16,87	17,09	16,67
cel-miR-39	15,72	17,14	16,46	16,81	16,59	16,44
SNORD61	29,37	31,96	30,7	31,22	31,02	30,44
SNORD68	30,27	32,12	29,18	33,99	32,85	31,68
SNORD72	34,16	N/A	34,43	N/A	N/A	N/A
SNORD95	25,22	27,52	25,01	25,9	25,35	25,05
SNORD96A	29,84	31,26	29,05	30,16	29,61	29,31
RNU6-2	31,36	31,84	31,09	31,18	31,76	30,29
miRTC	16,51	16,57	16,94	16,86	16,9	16,85
miRTC	16,53	16,93	17,1	16,76	16,98	17,17
PPC	18,97	19,22	19,29	19,33	19,03	19,27
PPC	19,5	20,06	20,63	19,17	19,25	19,44
plate2						
cel-miR-39	16,23	17,11	16,72	17,04	16,27	16,48
cel-miR-39	16,11	16,69	16,36	16,63	16,16	16,64
SNORD61	28,98	32,06	29,69	32,19	29,84	30,1
SNORD68	30,76	35,61	23,76	32,58	32,23	31,25
SNORD72	33,92	N/A	N/A	N/A	N/A	34,17
SNORD95	25,74	26,28	24,82	26,01	25,19	25,22
SNORD96A	29,4	32,19	29,15	30,13	28,72	29,16
RNU6-2	30,26	29,87	30,58	30,62	30,18	30,16
miRTC	16,68	16,56	17,03	17,08	16,39	16,69
miRTC	16,65	16,37	16,81	16,82	16,32	17,25
PPC	19,5	19,14	19,4	19,39	19,01	19,28
PPC	18,95	19,65	18,95	18,93	18,72	19,34
plate3						
cel-miR-39	16,62	16,87	16,77	16,8		16,54
cel-miR-39	16,01	16,48	16,45	16,76		16,27
SNORD61	29,69	30,41	30,11	33,02		29,05
SNORD68	30,89	33,4	31,29	31,22		30,79
SNORD72	33,59	N/A	N/A	N/A		33,89
SNORD95	25,3	26,66	25,01	25,79		25,09
SNORD96A	29,85	32,02	29,22	29,91		29,3
RNU6-2	31,1	31,43	31,56	31,16		29,91
miRTC	16,7	16,67	16,79	16,74		16,96
miRTC	17,02	16,83	17,05	16,92		16,79
PPC	19,28	19,12	18,92	19,43		19,64
PPC	19,47	19,44	19,32	19,52		19,49

Vol3			
plate1	mo	mi	ab
cel-miR-39	17,13	17,08	16,55
cel-miR-39	16,67	16,81	16,34
SNORD61	33,41	32,92	28,71
SNORD68	31,63	32,38	31,67
SNORD72	N/A	N/A	36,78
SNORD95	26,63	26,4	25,14
SNORD96A	30,06	30,11	28,83
RNU6-2	29,79	31,79	30,11
miRTC	17,34	17,1	16,66
miRTC	17,41	17,12	17,07
PPC	19,34	19,18	19,09
PPC	20,24	19,39	19,05
plate2			
cel-miR-39	17,15	16,89	16,57
cel-miR-39	16,96	16,66	16,06
SNORD61	32,02	32,71	28,9
SNORD68	32,44	32,19	32,9
SNORD72	N/A	N/A	N/A
SNORD95	26,1	26,24	25,61
SNORD96A	29,41	29,91	28,54
RNU6-2	29,52	31,82	30,48
miRTC	17,09	17,21	16,89
miRTC	17,34	17,13	16,61
PPC	19,15	19,43	19,39
PPC	19,46	19,5	19,52
plate3			
cel-miR-39	17,15	17,08	16,86
cel-miR-39	16,91	16,95	16,44
SNORD61	31,46	32,64	29,12
SNORD68	32,3	32,98	32,21
SNORD72	N/A	N/A	N/A
SNORD95	25,88	26,28	26,03
SNORD96A	29,42	30,54	28,98
RNU6-2	29,34	31,04	29,77
miRTC	17,18	16,93	16,75
miRTC	17,34	17,28	16,46
PPC	19,65	19,46	18,82
PPC	19,44	19,55	19,43

	Vol4/1			Vol4/2		
plate1	mo	mi	ab	mo	mi	ab
cel-miR-39	16,24	15,46	15,62	15,39	15,94	15,48
cel-miR-39	16,14	15,47	15,17	15,12	15,42	15,45
SNORD61	31,31	30,27	29,29	29,34	30,11	28,37
SNORD68	31,01	31,46	29,68	29,3	32,39	31,98
SNORD72	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	35,48
SNORD95	25,44	25,66	24,9	24,94	25,53	24,09
SNORD96A	31,02	29,54	28,38	29,05	30,17	30,18
RNU6-2	30,42	30,53	29,46	29,15	30,97	31,17
miRTC	16,52	16,76	16,54	16,7	16,74	17,11
miRTC	16,81	17,42	16,62	16,67	16,97	17,21
PPC	19,36	19,24	19,3	18,73	19,55	19,53
PPC	19,43	19,09	19,22	19,22	19,31	19,47
plate2						
cel-miR-39	16,01	15,61	15,83	15,44	16,02	15,4
cel-miR-39	16,03	15,42	15,51	15,2	15,56	15,43
SNORD61	30,81	29,76	28,86	29,27	30,12	29,65
SNORD68	31,3	31,16	29,43	30,17	32,07	30,15
SNORD72	N/A	N/A	35,04	N/A	N/A	32,8
SNORD95	25,54	25,72	24,89	24,87	26,02	24,08
SNORD96A	29,86	29,22	28,05	28,92	30,15	28,5
RNU6-2	30,6	31,26	30,12	30,46	29,89	31,81
miRTC	16,49	16,89	16,55	16,63	16,81	16,78
miRTC	16,57	17,1	16,66	17,09	16,85	17,01
PPC	19,38	19,19	19,51	19,4	19,39	19,68
PPC	19,34	19,21	19,47	19,27	18,97	19,45
plate3						
cel-miR-39		16,08	15,61	15,15	15,76	15,49
cel-miR-39		15,48	15,28	14,92	15,55	15,67
SNORD61		31,3	28,48	28,93	30,21	28,75
SNORD68		31,99	30,04	29,8	31,83	30,45
SNORD72		N/A	33,2	34,76	32,8	N/A
SNORD95		25,88	24,52	24,57	25,37	23,79
SNORD96A		29,9	28,03	28,3	28,97	30,57
RNU6-2		30,47	30,1	29,78	30,47	31,86
miRTC		16,88	16,51	16,62	16,83	16,9
miRTC		16,98	16,68	17,05	17,11	16,87
PPC		18,79	19,39	19,59	19,51	19,21
PPC		19,59	19,42	19,62	19,76	19,2

10.3 Routinelaboruntersuchung der Probanden

- Blutentnahme am 15.11.2013: Vol1, Vol2/1, Vol3, Vol4/1
- Blutentnahme am 23.11.2013: Vol2/2, Vol4/2



Patient
01-2A [00131115012-02] Vol 1
Geburtsdatum:

Einsender
Privatambulanz Zentrallabor Telefon: 06841/16-30700 Telefax: 06841/16-30703 Kurz-ID: 22626827 Auftrag: 131115Z0274 (15.11.2013 08:48)

Befund Druckdatum : 15.11.2013 - 10:37 (Routine)

Analyse	15/11/2013 08:48	Einheit	Referenzbereich
----- Klinische Chemie - Basis (Serum / EDTA-Blut / Plasma) -----			
Natrium	141	mmol/l	135-145
Kalium	4.7	mmol/l	3.5-5.1
Chlorid	104	mmol/l	98-107
Kalzium	2.4	mmol/l	2.2-2.6
Kalzium, korrigiert	2.2	mmol/l	2.2-2.6
Magnesium	0.89	mmol/l	0.70-0.95
Eisen	81	µg/dl	33-193
Phosphat	3.4	mg/dl	2.5-4.5
Kreatinin	1.11	mg/dl	
Harnstoff	29	mg/dl	17-48
Harnsäure	4.2	mg/dl	
Glukose	100	mg/dl	60-100
Eiweiß	73	g/l	66-87
Albumin	49	g/l	35-52
CK	202	U/l	
ASAT (GOT)	24	U/l	
ALAT (GPT)	20	U/l	
gamma-GT	13	U/l	
Alk. Phosphatase	53	U/l	
Bilirubin (ges.)	0.9	mg/dl	<1.2
Pankreas-Amylase	33	U/l	13-53
Lipase	* 71	U/l	13-60
LDH	186	U/l	0-289
----- Hämatologie (In Kooperation mit der Inneren Medizin I) -----			
----- Kleines Blutbild -----			
Leukozyten	6.0	10 ⁹ /l	4.0-10.0
Erythrozyten	4.87	10 ¹² /l	
Hb	13.6	g/dl	
Hkt	40	%	
MCV	83	f1	80-99
MCH	28	pg	27-33
MCHC	34	g/dl	31-37
RDW	14.2	%	11.5-14.5
Thrombozyten	270	10 ⁹ /l	140-400
MPV	10.7	f1	7.8-11.0
Normoblasten	0	/100 Leu	

Innere II, Dr. Schneider, Rebecca Scheffen, chrono Rhythmus			

Befundstatus: Vorabbebefund

Zuständig: Fr. Dr. Kirsch-Dahmen


Seite: 1 von 2

Resultatkennzeichen: * = Referenzwertverletzung ! = Extremwert # = Wert telefonisch mitgeteilt

Patient
01-2A [00131115012-02] Voll
Geburtsdatum:

Einsender
Privatambulanz Zentrallabor Telefon: 06841/16-30700 Telefax: 06841/16-30703 Kurz-ID: 22626827 Auftrag: 131115Z0274 (15.11.2013 08:48)

Befund Druckdatum : 15.11.2013 - 10:37 (Routine)

Analyse	15/11/2013 08:48	Einheit	Referenzbereich
Differentialblutbild			
Neutrophile	* 48	%	50-75
Neutrophile (abs.)	2.9	10 ⁹ /l	2.0-7.0
Lymphozyten	33	%	25-45
Monozyten	* 10	%	2-10
Eosinophile	* 6	%	0-5
Basophile	* 1	%	0-1
Immunologie			
CRP	0.7	mg/l	0.0-5.0
Ferritin	* 11	ng/ml	s. Ref.liste
Klinische Chemie - Spezial			
Cholesterin	182	mg/dl	<200
Triglyzeride	67	mg/dl	<150
HDL-Cholesterin	61	mg/dl	
Hormone (Serum / EDTA-Blut)			
TSH	3.45	µIU/ml	0.27-4.20
Cortisol	16.4	µg/dl	6.20-19.4
Referenzbereich gültig für Blutentnahme zwischen 7- und 9 Uhr.			
			
----- Innere II, Dr. Schneider, Rebecca Scheffen, chrono Rhythmus -----			


Befundstatus: Vorabbefund Zuständig: Fr. Dr. Kirsch-Dahmen
 Seite: 2 von 2 Resultatkennzeichen: * = Referenzwertverletzung ! = Extremwert # = Wert telefonisch mitgeteilt

Patient
02-2A [00131115022-00]
Vol 211
Geburtsdatum:

Einsender
Privatambulanz Zentrallabor
Telefon: 06841/16-30700 Telefax: 06841/16-30703
Kurz-ID: 22626828
Auftrag: 131115Z0279 (15.11.2013 08:50)

Befund Druckdatum : 15.11.2013 - 10:37 (Routine)

Analyse	15/11/2013 08:49	Einheit	Referenzbereich
----- Klinische Chemie - Basis (Serum / EDTA-Blut / Plasma) -----			
Natrium	139	mmol/l	135-145
Kalium	3.8	mmol/l	3.5-5.1
Chlorid	100	mmol/l	98-107
Kalzium	2.4	mmol/l	2.2-2.6
Kalzium, korrigiert	2.2	mmol/l	2.2-2.6
Magnesium	0.76	mmol/l	0.70-0.95
Eisen	57	µg/dl	33-193
Phosphat	4.2	mg/dl	2.5-4.5
Kreatinin	1.27	mg/dl	
Harnstoff	36	mg/dl	17-48
Harnsäure	5.4	mg/dl	
Glukose	* 101	mg/dl	60-100
Eiweiß	77	g/l	66-87
Albumin	48	g/l	35-52
CK	115	U/l	
ASAT (GOT)	27	U/l	
ALAT (GPT)	28	U/l	
gamma-GT	18	U/l	
Alk. Phosphatase	61	U/l	
Bilirubin (ges.)	0.8	mg/dl	<1.2
Pankreas-Amylase	30	U/l	13-53
Lipase	37	U/l	13-60
LDH	176	U/l	0-289
----- Hämatologie (In Kooperation mit der Inneren Medizin I) -----			
----- Kleines Blutbild -----			
Leukozyten	6.6	10 ⁹ /l	4.0-10.0
Erythrozyten	5.12	10 ¹² /l	
Hb	14.2	g/dl	
Hkt	42	%	
MCV	81	fl	80-99
MCH	28	pg	27-33
MCHC	34	g/dl	31-37
RDW	13.2	%	11.5-14.5
Thrombozyten	277	10 ⁹ /l	140-400
MPV	9.4	fl	7.8-11.0
Normoblasten	0	/100 Leu	

 Innere II, Dr. Schneider, Rebecca Scheffen, chrono Rhythmus			

Befundstatus: Vorabbebefund Zuständig: Fr. Dr. Kirsch-Dahmen
 Seite: 1 von 2 Resultatkennzeichen: * = Referenzwertverletzung != Extremwert # = Wert telefonisch mitgeteilt

Patient
02-2A
 [00131115022-00] Vol 2/1
 Geburtsdatum:

Einsender
Privatambulanz Zentrallabor
 Telefon: 06841/16-30700 Telefax: 06841/16-30703
 Kurz-ID: 22626828
 Auftrag: 131115Z0279 (15.11.2013 08:50)

Befund Druckdatum : 15.11.2013 - 10:37 (Routine)

Analyse	15/11/2013 08:49	Einheit	Referenzbereich
----- Differentialblutbild -----			
Neutrophile	* 47	%	50-75
Neutrophile (abs.)	3.1	10 ⁹ /l	2.0-7.0
Lymphozyten	41	%	25-45
Monozyten	8	%	2-10
Eosinophile	4	%	0-5
Basophile	0	%	0-1
----- Immunologie -----			
CRP	<0.3	mg/l	0.0-5.0
Ferritin	* 10	ng/ml	s. Ref. liste
----- Klinische Chemie - Spezial -----			
Cholesterin	* 211	mg/dl	<200
Triglyzeride	86	mg/dl	<150
HDL-Cholesterin	76	mg/dl	
----- Hormone (Serum / EDTA-Blut) -----			
TSH	2.27	µIU/ml	0.27-4.20
Cortisol	16.6	µg/dl	6.20-19.4

Λ)

Innere II, Dr. Schneider, Rebecca Scheffen, chrono Rhythmus

Befundstatus: Vorabbe fund Zuständig: Fr. Dr. Kirsch-Dahmen
 Seite: 2 von 2 Resultatkennzeichen: * = Referenzwertverletzung ! = Extremwert # = Wert telefonisch mitgeteilt

Patient
02-3A [00131122023-06] Vol 212
Geburtsdatum:

Einsender
Privatambulanz Zentrallabor Telefon: 06841/16-30700 Telefax: 06841/16-30703 Kurz-ID: 22513351 Auftrag: 131122Z0294 (22.11.2013 09:05)

Befund Druckdatum : 22.11.2013 - 15:03 (Routine)
 Kopie mit Stand vom : 22.11.2013 - 10:37

Analyse	22/11/2013 08:55	Einheit	Referenzbereich
----- Klinische Chemie - Basis (Serum / EDTA-Blut / Plasma) -----			
Natrium	141	mmol/l	135-145
Kalium	4.1	mmol/l	3.5-5.1
Chlorid	100	mmol/l	98-107
Kalzium	2.3	mmol/l	2.2-2.6
Kalzium, korrigiert	2.2	mmol/l	2.2-2.6
Magnesium	0.80	mmol/l	0.70-0.95
Eisen	44	µg/dl	33-193
Phosphat	3.7	mg/dl	2.5-4.5
Kreatinin	1.18	mg/dl	
Harnstoff	36	mg/dl	17-48
Harnsäure	6.9	mg/dl	
Glukose	85	mg/dl	60-100
Eiweiß	75	g/l	66-87
Albumin	46	g/l	35-52
CK	184	U/l	
ASAT (GOT)	27	U/l	
ALAT (GPT)	22	U/l	
gamma-GT	19	U/l	
Alk. Phosphatase	56	U/l	
Bilirubin (ges.)	0.7	mg/dl	<1.2
Pankreas-Amylase	29	U/l	13-53
Lipase	37	U/l	13-60
LDH	185	U/l	0-289
----- Hämatologie (In Kooperation mit der Inneren Medizin I) -----			
----- Kleines Blutbild -----			
Leukozyten	4.5	10 ⁹ /l	4.0-10.0
Erythrozyten	4.91	10 ¹² /l	
Hb	13.3	g/dl	
Hkt	40	%	
MCV	81	fl	80-99
MCH	27	pg	27-33
MCHC	33	g/dl	31-37
RDW	13.1	%	11.5-14.5
Thrombozyten	282	10 ⁹ /l	140-400
MPV	9.3	fl	7.8-11.0
Normoblasten	0	/100 Leu	

Innere II, Dr. Schneider, Rebecca Scheffen, chromo Rhythmus			

Befundstatus: Modifiziert		Zuständig: Dr. Hübner	
Seite: 1 von 2 Resultatkennzeichen: * = Referenzwertverletzung ! = Extremwert # = Wert telefonisch mitgeteilt			

Patient
02-3A
 [00131122023-06] Vol 2/2
 Geburtsdatum:

Einsender
Privatambulanz Zentrallabor
 Telefon: 06841/16-30700 Telefax: 06841/16-30703
 Kurz-ID: 22513351
 Auftrag: 131122Z0294 (22.11.2013 09:05)

Befund Druckdatum : 22.11.2013 - 15:03 (Routine)
 Kopie mit Stand vom : 22.11.2013 - 10:37

Analyse	22/11/2013 08:55	Einheit	Referenzbereich
Differentialblutbild			
Neutrophile	51	%	50-75
Neutrophile (abs.)	2.3	10 ⁹ /l	2.0-7.0
Lymphozyten	35	%	25-45
Monozyten	* 10	%	2-10
Eosinophile	4	%	0-5
Basophile	0	%	0-1
Immunologie			
CRP	<0.3	mg/l	0.0-5.0
Ferritin	* 10	ng/ml	s. Ref. liste
Klinische Chemie - Spezial			
Cholesterin	* 201	mg/dl	<200
Triglyzeride	31	mg/dl	<150
HDL-Cholesterin	86	mg/dl	
Hormone (Serum / EDTA-Blut)			
TSH	2.25	µIU/ml	0.27-4.20
Cortisol	15.3	µg/dl	6.20-19.4
Referenzbereich gültig für Blutentnahme zwischen 7- und 9 Uhr.			

Innere II, Dr. Schneider, Rebecca Scheffen, chromo Rhythmus			

Befundstatus: Modifiziert		Zuständig: Dr. Hübner	
Seite: 2 von 2 Resultatkennzeichen: * = Referenzwertverletzung != Extremwert # = Wert telefonisch mitgeteilt			

Patient
04-3A
[00131122043-02]
Vol 4/2
Geburtsdatum:

Einsender
Privatambulanz Zentrallabor
Telefon: 06841/16-30700 Telefax: 06841/16-30703
Kurz-ID: 22513350
Auftrag: 131122Z0298 (22.11.2013 09:05)

Befund Druckdatum : 22.11.2013 - 15:03 (Routine)
 Kopie mit Stand vom : 22.11.2013 - 10:37

Analyse	22/11/2013 09:10	Einheit	Referenzbereich
----- Klinische Chemie - Basis (Serum / EDTA-Blut / Plasma) -----			
Natrium	139	mmol/l	135-145
Kalium	4.8	mmol/l	3.5-5.1
Chlorid	103	mmol/l	98-107
Kalzium	2.4	mmol/l	2.2-2.6
Kalzium, korrigiert	2.2	mmol/l	2.2-2.6
Magnesium	0.88	mmol/l	0.70-0.95
Eisen	67	µg/dl	33-193
Phosphat	3.7	mg/dl	2.5-4.5
Kreatinin	0.95	mg/dl	
Harnstoff	30	mg/dl	17-48
Harnsäure	5.6	mg/dl	
Glukose	86	mg/dl	60-100
Eiweiß	75	g/l	66-87
Albumin	50	g/l	35-52
CK	162	U/l	
ASAT (GOT)	27	U/l	
ALAT (GPT)	31	U/l	
gamma-GT	28	U/l	
Alk. Phosphatase	60	U/l	
Bilirubin (ges.)	0.4	mg/dl	<1.2
Pankreas-Amylase	36	U/l	13-53
LDH	86	U/l	0-289
----- Hämatologie (In Kooperation mit der Inneren Medizin I) -----			
----- Kleines Blutbild -----			
Leukozyten	5.2	10 ⁹ /l	4.0-10.0
Erythrozyten	5.30	10 ¹² /l	
Hb	15.2	g/dl	
Hkt	45	%	
MCV	86	fl	80-99
MCH	29	pg	27-33
MCHC	34	g/dl	31-37
RDW	13.3	%	11.5-14.5
Thrombozyten	233	10 ⁹ /l	140-400
MPV	10.1	fl	7.8-11.0
Normoblasten	0	/100 Leu	
----- Differentialblutbild -----			
Neutrophile	51	%	50-75
Neutrophile (abs.)	2.7	10 ⁹ /l	2.0-7.0
Lymphozyten	37	%	25-45
Monozyten	* 10	%	2-10
Eosinophile	1	%	0-5
Basophile	0	%	0-1

Innere II, Schneider, Scheffen, chrono Rhythmus			

Befundstatus: Modifiziert Zuständig: Dr. Hübner
 Seite: 1 von 2 Resultatkennzeichen: * = Referenzwertverletzung ! = Extremwert # = Wert telefonisch mitgeteilt

11 Danksagungen

An allererster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Schneider für die Auswahl dieses spannenden Themas und seine kontinuierliche Betreuung und Motivation danken.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Prof. Dr. Lammert für die Möglichkeit an seiner Klinik promovieren zu dürfen.

Zudem danke ich Frau Prof. Dr. Stephanie Kreis der Universität Luxemburg, die mir zusammen mit Prof. Dr. Schneider die Kooperation mit der Arbeitsgruppe in Luxemburg ermöglichte.

Darüber hinaus möchte ich auch Christiane Margue für ihre tatkräftige Unterstützung in Luxemburg danken. Dies gilt in gleichem Maße für Iris Adrian, die mir in Homburg bei allen technischen und organisatorischen Fragen zur Seite stand.

Zuletzt gilt mein Dank auch meinen Freunden und insbesondere meiner Familie, die mich immer wieder motivierten und die ich immer an meiner Seite wusste.

Allen möchte ich nochmals meinen herzlichsten Dank aussprechen.

12 Publikationen

Die Grundzüge der Ergebnisse dieser Dissertation wurden 2016 auf dem Kongress der deutschen Gesellschaft für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin als Poster präsentiert und ein kurzer Abstract im „Abstractband 2016“ veröffentlicht [25].

13 Lebenslauf

„Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.“