

Aus der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative
Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle der Autophagie in Dexmedetomidin-induzierter
Neuroprotektion

The Role of Autophagy in Dexmedetomidine-induced
Neuroprotection

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Widuri Miriam Kho

aus Köln

Datum der Promotion: 03.03.2023

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1 ZUSAMMENFASSUNG	5
1.1 Abstract deutsch	5
1.2 Abstract englisch	6
2 MANTELTEXT	8
2.1 Einleitung und Zielsetzung	8
2.1.1 Fragestellung	15
2.2 Methodik	16
2.2.1 Tiermodell	16
2.2.2 Proteinexpressionsanalysen mittels Western Blot	17
2.2.3 miRNA-Expressionsanalysen	18
2.2.4 Acetylcholin-Expressions- und Acetylcholinesterase-Aktivitätsanalysen	20
2.2.5 Statistische Auswertung	21
2.3 Ergebnisse	22
2.3.1 Der Einfluss von Dexmedetomidin auf die Expression von Autophagie-assoziierten Proteinen	22
2.3.2 Der Einfluss von Dexmedetomidin auf die Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen	24
2.3.3 Der Einfluss von Dexmedetomidin auf die Expression von Autophagie- und Inflammations-assoziierten miRNAs	26
2.3.4 Der Einfluss von Dexmedetomidin auf die Expression von Acetylcholin und die Aktivität der Acetylcholinesterase	31
2.4 Diskussion	35
2.4.1 Autophagie und Apoptose	36
2.4.2 Regulation durch miRNAs	39
2.4.3 Cholinerges System	42
2.4.4 Limitationen	43
2.4.5 Zusammenfassung und Ausblick	44
2.5 Literaturverzeichnis	46
3 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	54
4 ANTEILSERKLÄRUNG AN DEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	55
5 AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST	57
6 DRUCKEXEMPLAR DER PUBLIKATION	60
7 LEBENSLAUF	77
8 KOMPLETTE PUBLIKATIONSLISTE	79
9 DANKSAGUNG	80

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
APAF1	Apoptose-auslösenden Faktor-1
ATG5/Atg5	Autophagy-related 5
ATG7	Autophagy-related 7
ATG9	Autophagy-related 9
Atgs	Autophagie-assoziierte Proteine
BAK	Bcl-2 homologous antagonist killer
BAX	Proteine Bcl-2 associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BID	BH3 Interacting Domain Death Agonist
BSA	Bovines Serumalbumin
CLP	Cecal Ligation Puncture
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DEX	Dexmedetomidin
FoxO3a	Forkhead-Box-Protein O3
h	Stunde
HRP	Horseradish Peroxidase
i.p.	intraperitoneal
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
LC3-I/II	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LPS	Lipopolysaccharid
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NE	Noradrenalin
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PI3KC3	Klasse III Phosphoinositid-3-Kinase
PINK1	PTEN-induced kinase 1
POCD	Postoperatives kognitives Defizit
POD	Postoperatives Delir
Real-Time-PCR	Real-Time quantitative Polymerasekettenreaktion
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
SCI	Spinal Cord Injury
SQSTM1/p62	Sequestosome 1

TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
ULK1	Unc-51-like kinase 1
ZNS	Zentrales Nervensystem
α 2-AR	α 2-Adrenozeptor
α 7nAChR	nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor α 7
β 2-AR	β 2-adrenerger Rezeptor

1 Zusammenfassung

1.1 Abstract deutsch

Kognitive Dysfunktionen, wie das postoperative Delir (POD) oder das postoperative kognitive Defizit (POCD), können nach operativen Eingriffen auftreten und stellen durch die stetig ansteigende Zahl an Operationen eine immer größer werdende Belastung für unser Gesundheitssystem dar. Es existieren verschiedene Hypothesen zur Ätiologie. Die Neuroinflammationshypothese besagt, dass POD und POCD die Folgen einer durch den perioperativen Stress induzierten Neuroinflammation sind. Dieser Zusammenhang wurde sowohl experimentell als auch klinisch gezeigt. Aufgrund der komplexen molekularen Mechanismen hinter POD/POCD ist eine pharmakologische Therapie jedoch schwierig. Ein vielversprechendes Medikament zur Prävention von kognitiven Dysfunktionen ist der α 2-Adrenozeptor (α 2-AR)-Agonist Dexmedetomidin (DEX), der zudem organprotektive und anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt. Die genauen protektiven Mechanismen dieses Medikaments sind jedoch nicht vollends verstanden. Daher wurde in dieser Arbeit ein Tiermodell einer systemischen Inflammation genutzt, um die Wirkmechanismen einer präventiven DEX-Gabe zu untersuchen. Dazu wurde adulten männlichen Wistar-Ratten Lipopolysaccharid (LPS) intraperitoneal (i.p.) injiziert, um eine systemische Inflammation zu erzeugen und das Kontrollvehikel Natriumchlorid (NaCl) oder das Medikament DEX präventiv vor der LPS-Injektion appliziert, um die Wirkweise von DEX zu untersuchen. Das Medikament DEX wurde hinsichtlich seines Einflusses auf die zellulären Prozesse der Autophagie, Apoptose und des cholinergen anti-inflammatorischen Reflexes erforscht sowie hinsichtlich der posttranskriptionalen Regulation durch microRNAs (miRNAs), welche die Autophagie, Apoptose und Inflammation modulieren. Dazu wurden die Milz als größtes lymphatisches Organ sowie das Gehirn (Cortex und Hippocampus) zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (6 h, 24 h und 7 d) untersucht, indem miRNA-Analysen mittels Real-Time-PCR sowie Proteinanalysen mittels Western Blot und Aktivitätsassays mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt wurden. DEX konnte die LPS-induzierten Störungen des autophagischen Flusses in der Milz beheben sowie den Apoptose-Marker cleaved Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) in der Milz abschwächen. Zusätzlich war DEX in der Lage, die LPS-induzierten Veränderungen der miRNA-Expression in der Milz sowie im Hippocampus zu verhindern bzw. abzuschwächen und modulierte außerdem

auch unabhängig von LPS die miRNA-Expression in der Milz, im Cortex und im Post FormaleHippocampus. Zudem wurde sowohl durch LPS als auch durch DEX die Acetylcholin (ACh)-Expression sowie die Acetylcholinesterase (AChE)-Aktivität in der Milz, im Cortex und im Hippocampus verändert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die protektiven Mechanismen von DEX durch die Wiederherstellung der Autophagie vermittelt werden und eine posttranskriptionale Regulation durch miRNAs und das cholinerge System eine essenzielle Rolle dabei spielen.

1.2 Abstract englisch

Cognitive dysfunctions, such as postoperative delirium (POD) or postoperative cognitive deficit (POCD), might follow surgical procedures and represent an ever-increasing burden for our health care system due to the constantly rising number of surgeries. Several hypotheses regarding the etiology exist. The neuroinflammation hypothesis states that POD and POCD are the result of neuroinflammation induced by perioperative stress. This link has been demonstrated both experimentally and clinically. Due to the complex molecular mechanisms behind POD/POCD pharmacological therapy is difficult. One promising drug for the prevention of cognitive dysfunction is the α 2-adrenoceptor (α 2-AR) agonist dexmedetomidine (DEX), which also has organ-protective and anti-inflammatory properties. However, the exact protective mechanisms of this drug are not fully understood. Therefore, in the present study, an animal model of a systemic inflammation was used to investigate the mechanisms of action of a preventive DEX administration. For this purpose, adult male Wistar rats were injected lipopolysaccharide (LPS) intraperitoneally (i.p.) to induce a systemic inflammation. In addition, the control vehicle sodium chloride (NaCl) or the drug DEX was applied preemptively before the LPS injection to investigate the mode of action of DEX. The drug DEX was investigated in terms of its influence on the cellular processes of autophagy, apoptosis, and the cholinergic anti-inflammatory reflex, and in term of posttranscriptional regulation by microRNAs (miRNAs) modulating autophagy, apoptosis, and inflammation. For this purpose, the spleen as the largest lymphoid organ and the brain (cortex and hippocampus) were examined at three different time points (6 h, 24 h, and 7 d) by performing miRNA analyses using real-time PCR and protein analyses using Western blot as well as activity assays using fluorescence spectroscopy. DEX was able to reverse the LPS-induced disruption of the autophagic flux in the spleen as well as to attenuate

the apoptosis marker cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in the spleen. Moreover, DEX was able to prevent or attenuate the LPS-induced changes in miRNA expression in the spleen and hippocampus and also modulated miRNA expression in the spleen, cortex, and hippocampus independently of LPS. Furthermore, both LPS and DEX altered acetylcholine (ACh) expression and acetylcholinesterase (AChE) activity in the spleen, cortex, and hippocampus. These results suggest that the protective mechanisms of DEX are mediated by restoring autophagy and that posttranscriptional regulation by miRNAs as well as molecules of the cholinergic system play an essential role in this process.

2 Manteltext

Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit wurden im *Journal of Neuroimmune Pharmacology* unter dem Titel „*Dexmedetomidine Restores Autophagic Flux, Modulates Associated microRNAs and the Cholinergic Anti-inflammatory Pathway upon LPS-Treatment in Rats*“ publiziert [1]. Dieser Manteltext dient der Darstellung des Forschungsstandes, einer vertiefenden Schilderung der Methodik sowie der Beschreibung der wesentlichen neuen Ergebnisse und der sich daraus ergebenden wissenschaftlichen Fragestellungen.

2.1 Einleitung und Zielsetzung

Operationen und Infektionen können Entzündungsreaktionen im Körper hervorrufen, die wiederum zu kognitiven Defiziten führen und somit schwerwiegende Folgen für die Betroffenen haben [2]. Da mit dem Alter sowohl das allgemeine Risiko für Erkrankungen als auch die Wahrscheinlichkeit eines operativen Eingriffs ansteigt, stellen kognitive Defizite, die nach Operationen auftreten können, eine immer größer werdende Belastung für unsere alternde Gesellschaft und das Gesundheitssystem dar [3]. Diese postoperativen kognitiven Defizite äußern sich als akut auftretendes postoperatives Delir (POD) oder als langanhaltendes postoperatives kognitives Defizit (POCD) [4].

Die Ätiologie dieser Erkrankungen ist nicht vollends geklärt, es existieren jedoch verschiedene Hypothesen zur Entstehung [5]. Dabei ist eine der primären Hypothesen die Neuroinflammationshypothese [6], welche postuliert, dass POD und POCD die Folgen einer durch den perioperativen Stress induzierten Neuroinflammation sind [4]. Es wurde sowohl experimentell als auch klinisch ein Zusammenhang zwischen einer peripheren inflammatorischen Immunantwort und einer Neuroinflammation beobachtet [7]. Die Neuroinflammation kann wiederum neuronale und synaptische Störungen induzieren und damit kognitive Defizite begünstigen [5]. So wurde beispielsweise in tierexperimentellen Studien gezeigt, dass eine Lipopolysaccharid (LPS)-Injektion zu erhöhten Zytokinspiegeln (Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)), im Gehirn führt und diese mit kognitiven Defiziten einhergehen [8-11]. Daher ist eine kontrollierte Regulation der Immunantwort essenziell, um eine

Manteltext

Neuroinflammation zu vermindern und damit das Risiko für kognitive Defizite zu reduzieren.

Ein in diesem Kontext wichtiger Prozess ist die Autophagie – ein elementarer zellulärer Prozess aller Zellen, der dazu dient, zelleigene Bestandteile, wie geschädigte Proteine oder Organellen, proteolytisch abzubauen und zu recyceln. Es gibt verschiedene Formen der Autophagie, wobei die Makroautophagie die häufigste und am besten untersuchte Form ist [12]. Die Autophagie (Makroautophagie) ist ein kontinuierlicher Prozess und besteht aus verschiedenen Schritten, die durch eine Vielzahl von Autophagie-assoziierten Proteinen (Atgs) koordiniert werden (Abb. 1):

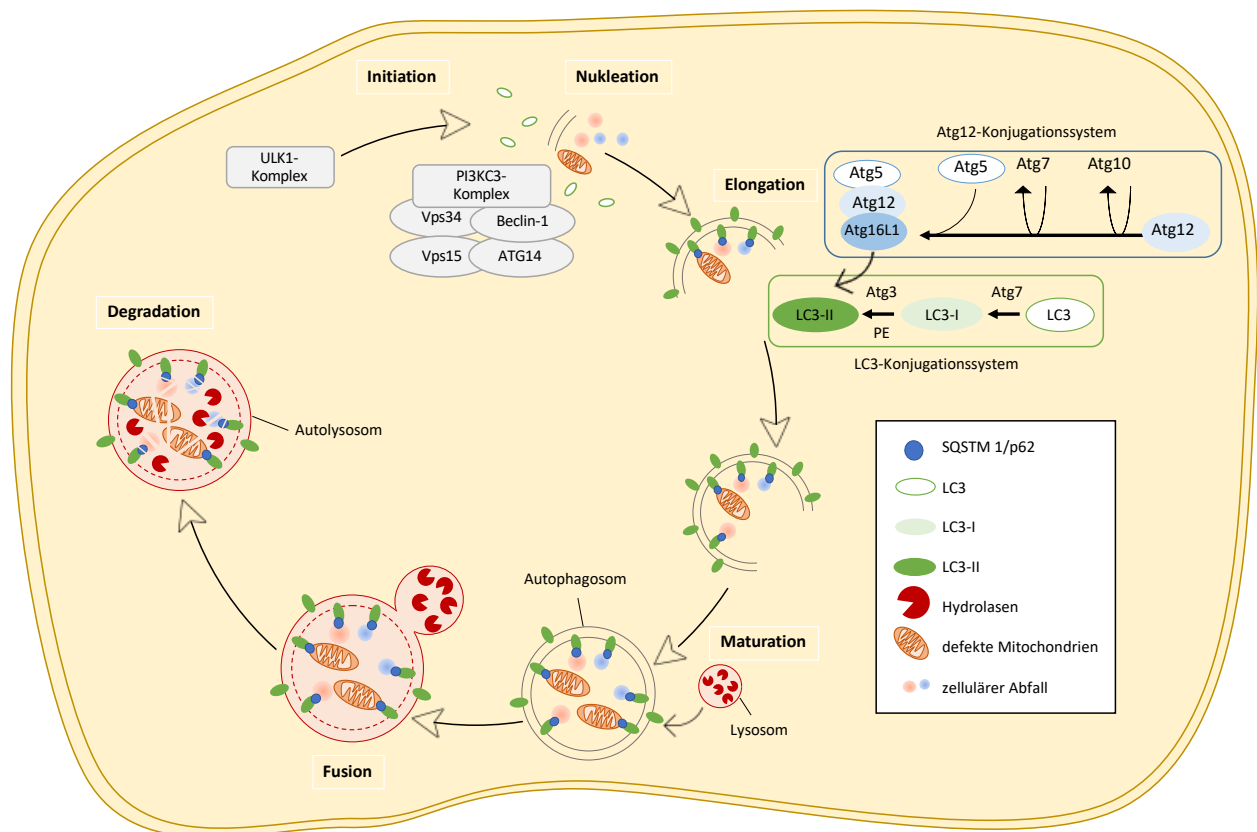


Abbildung 1: Die Schritte der Autophagie. Der Autophagieprozess findet in mehreren Schritten statt, die über Autophagie-assoziierte Proteine (Atgs) vermittelt werden. Die Initiation der Autophagie erfolgt über die Aktivierung des Unc-51-like kinase 1 (ULK1)-Komplexes, welcher wiederum den Klasse III Phosphoinositid-3-Kinase (PI3KC3)-Komplex I durch Phosphorylierungen aktiviert und so die Nukleation initiiert. In diesem zweiten Schritt wird die Bildung des Phagophors, der initialen Doppelmembran des Autophagosoms angeregt. Diese wächst während der Elongationsphase weiter an, um die zu verwertenden Zellbestandteile, wie fehlgefaltete Proteine oder defekte Zellorganellen, zu umschließen. Dieser Schritt wird über zwei Konjugationssysteme, dem Atg12-Konjugationssystem und dem Microtubule-associated protein 1 A/B-light chain 3 (LC3)-Konjugationssystem vermittelt. Dabei wird mithilfe des Atg12-Konjugationssystem das zytosolische LC3-I zu membrangebundenem LC3-II konvertiert, welches nicht nur

Manteltext

für die Elongation der Autophagosom-Membran wichtig ist, sondern auch für die Bindung des abzubauenden Materials, da Proteine wie das Cargo-bindende Sequestome 1 (SQSTM1)/p62 auch eine LC3-bindende Region besitzen und so das abzubauende Material im Inneren des Autophagosoms ansammeln. Das entstandene geschlossene Autophagosom reift während der Reifungsphase weiter an und fusioniert schließlich mit einem Lysosom. Im Autolysosom findet anschließend der Abbau des Zellmaterials sowie der darin enthaltenen Proteine, wie SQSTM1/p62 mithilfe von sauren Hydrolasen statt. Die daraus entstehenden Nährstoffe werden letztlich recycelt und wieder in das Zytoplasma freigegeben [12-14]. Erstellt mit Microsoft PowerPoint.

Im ersten Schritt, der Initiation der Autophagie, wird der Aufbau einer Isolationsmembran (Phagophor) eingeleitet. Diese bildet sich während der Elongationsphase unter Beteiligung verschiedener Konjugationssysteme um das abzubauende Zellmaterial bzw. die abzubauenden Zellorganellen und formt letztlich das fertige Autophagosom. Das Autophagosom fusioniert anschließend in der letzten Phase, der Degradation, mit einem Lysosom, sodass ein Autophagolysosom entsteht, in dem der Abbau des Zellmaterials bzw. der Zellorganellen stattfindet [15, 16].

Die Autophagie ist auf einem basalen Niveau immer aktiv, doch unter Stresssituation, wie Hunger, oxidativem Stress oder Infektionen verstärkt aktiviert [12]. Eine Dysregulation der Autophagie ist mit einer Reihe von Krankheiten, insbesondere neurodegenerativen Krankheiten, assoziiert [17-19]. Vor allem innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) spielt die Autophagie eine essenzielle Rolle, da Neurone als postmitotische Zellen besonders auf eine funktionierende Autophagie angewiesen sind, um angesammelte zelluläre Abfallprodukte, wie fehlgefaltete Proteine oder defekte Organellen etc. zu entfernen [18]. Auch innerhalb des Immunsystems hat die Autophagie entscheidende Funktionen: Sie kontrolliert die Sekretion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen [19-21], trägt zur Antigenpräsentation bei [20, 22, 23], reguliert die Polarisation von Th17-Zellen sowie die Entwicklung und das Überleben von B- und T-Zellen [21, 22].

Die Autophagie und Apoptose sind zwei eng miteinander verbundene Prozesse, die über das Schicksal von Zellen bestimmen. Stressoren, wie z.B. eine Inflammation, können beide Signalwege induzieren (Abb. 2). Wenn die Stressoren den Apoptosesignalweg aktivieren, findet ein kontrollierter Zelltod statt [24].

Manteltext

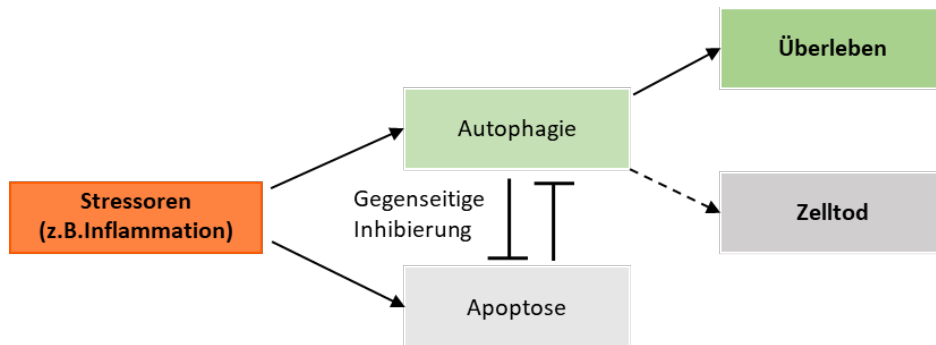


Abbildung 2: Die Beziehung zwischen Autophagie und Apoptose. Stressoren wie eine Inflammation können entweder den Autophagie- oder den Apoptose-Signalweg aktivieren und so über Leben und Tod der Zelle entscheiden. Dabei inhibieren sich die beiden Prozesse zu einem gewissen Teil gegenseitig. Dennoch spielt auch die Regulation der Autophagie eine wichtige Rolle, da eine zu stark ausgeprägte Autophagie auch zum Zelltod führen kann [24]. Erstellt mit Microsoft PowerPoint.

Je nach Signalart, kann die Apoptose über einen intrinsischen, mitochondrien-abhängigen oder einen extrinsischen, mitochondrien-unabhängigen Weg stattfinden (Abb. 3) [25]. Um rechtzeitig auf Umgebungsreize zu reagieren und so das Überleben der Zelle zu sichern, muss die Autophagie sich schnell anpassen können. Sie unterliegt daher starken posttranskriptionalen und -translationalen Modifikationen [26]. Neben Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen auf posttranskriptionaler Ebene spielen auch Modifikationen der messenger RNA (mRNA) durch microRNAs (miRNAs) auf posttranslationaler Ebene eine große Rolle [26]. Dabei handelt es sich um kleine, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die die Genexpression regulieren, indem sie an komplementäre mRNA-Stränge binden und diese entweder degradieren, ihre Translation verhindern oder diese aktivieren [26-28]. Neben der Kontrolle der Autophagie, stellen miRNAs auch eine wichtige regulatorische Funktion in vielen anderen biologischen Prozessen dar, wie beispielsweise der Regulation der Immunantwort [27].

Manteltext

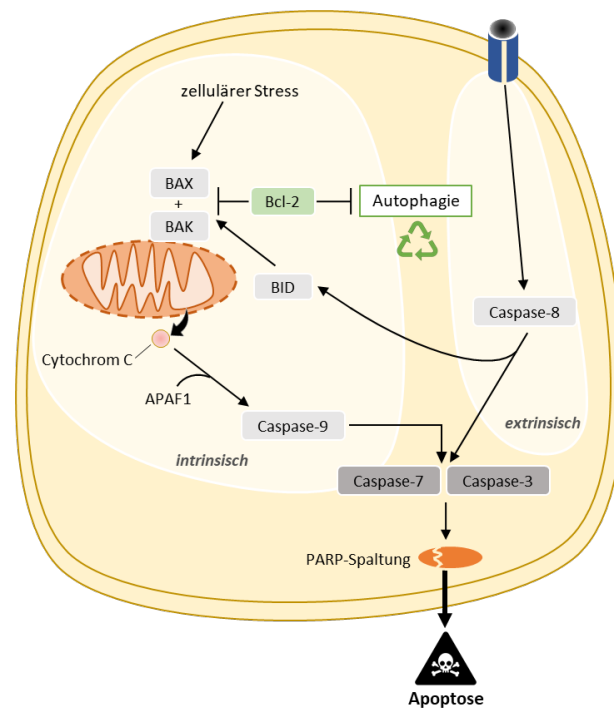


Abbildung 3: Der Apoptosesignalweg. Die Apoptose kann über zwei verschiedene Signalwege induziert werden, die beide zu einer Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 führen. Der intrinsische, mitochondrien-abhängige Signalweg wird über zelluläre Stresssignale aktiviert. Dabei entsteht über die Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine Bcl-2 associated X protein (BAX) und Bcl-2 homologous antagonist killer (BAK) eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, welche das Austreten von Cytochrom C ermöglicht. Das freigesetzte Cytochrom C bildet zusammen mit dem Apoptose-auslösenden Faktor-1 (APAF1) einen Komplex und aktiviert so Caspase-9, welches anschließend die Effektorcaspasen 7 und 3 aktiviert. Anti-apoptotische Proteine wie das B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) können die Apoptose inhibieren, indem sie die pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK hemmen und so zur Stabilität der Mitochondrienmembran beitragen. Bcl-2 inhibiert dabei nicht nur die Apoptose, sondern auch die Autophagie. Der extrinsische Apoptosesignalweg wird über den Todesrezeptor und extrazelluläre Liganden der TNF-Superfamilie ausgelöst und führt so zu einer Aktivierung von Caspase-8, welches anschließend auch die Effektorcaspasen 7 und 3 aktiviert. Zudem kann Caspase-8 auch zu einer Aktivierung von BH3 Interacting Domain Death Agonist (BID) führen, welches wiederum BAX und BAK aktiviert, sodass über BID auch der intrinsischen Apoptosesignalweg induziert werden kann [24, 25, 29]. Erstellt mit Microsoft PowerPoint.

Die besondere Bedeutung der Autophagie innerhalb des Nervensystems und des Immunsystems spiegelt sich auch im cholinergen anti-inflammatorischen Reflex wider. Dieser Signalweg verbindet über den Vagusnerv das ZNS mit dem Immunsystem. Der cholinerge anti-inflammatorische Reflex dient zum einen dazu, das Vorhandensein einer Entzündung an das Gehirn zu vermitteln und zum anderen, diese Entzündung zentral gesteuert einzudämmen (Abb. 4) [30, 31]. Dies geschieht durch die Ausschüttung von Noradrenalin, welches an β_2 -adrenerge Rezeptoren von Acetylcholin (ACh)-

Manteltext

produzierenden T-Zellen bindet, die wiederum ACh freisetzen, welches anschließend an den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$) auf anderen Immunzellen, wie Makrophagen, bindet und damit die Zytokinproduktion in diesen Zellen hemmt. Der cholinerge anti-inflammatorische Reflex besitzt daher eine wichtige zentrale Rolle in der Immunregulation und eine Aktivierung des $\alpha 7nAChR$ geht mit einer Aktivierung der Autophagie einher [32, 33].

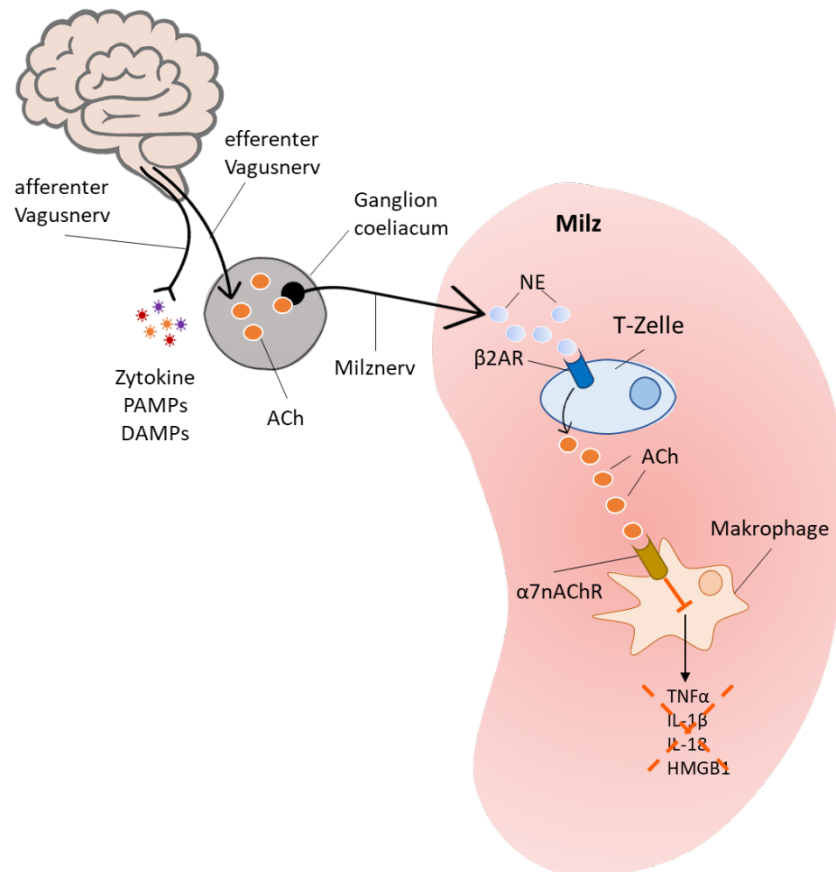


Abbildung 4: Der cholinerge anti-inflammatorische Reflex. Der afferente Ast des Vagusnervs kann durch Zytokine, damage associated molecular patterns (DAMPs) und pathogen associated molecular patterns (PAMPs) in der Peripherie aktiviert werden, wodurch der efferente Ast des Vagusnervs angeregt wird. Das ausgeschüttete Acetylcholin (ACh) kann im Ganglion coeliacum den Milznerv aktivieren, sodass Noradrenalin (NE) in der Milz freigesetzt wird, welches an den $\beta 2$ -adrenergen Rezeptor ($\beta 2$ -AR) von ACh-produzierenden T-Zellen bindet, die wiederum ACh ausschütten. Das freigesetzte ACh bindet an den $\alpha 7nAChR$ von Makrophagen und reduziert so die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Mediatoren [30, 31, 34]. Erstellt mit Microsoft PowerPoint.

Aufgrund der noch nicht vollständig verstandenen Ätiologie von kognitiven Defiziten nach Operationen sowie der damit verbundenen komplexen molekularen Mechanismen ist die pharmakologische Therapie dieser Erkrankungen schwierig.

Manteltext

Ein vielversprechendes Medikament zur Reduktion kognitiver Defizite ist der α_2 -Adrenozeptor (α_2 -AR)-Agonist Dexmedetomidin (DEX) (Abb. 5). Diese Substanz besitzt sedierende, analgesierende und muskelrelaxierende Eigenschaften und ist seit 2011 in Europa für die Sedierung erwachsener, intensivmedizinisch behandelter Patienten zugelassen [35]. Mehrere klinischen Studien zeigen, dass eine intra- oder postoperative DEX-Gabe das Risiko für POD signifikant reduziert [36-38]. Zudem zeigt der α_2 -AR-Agonist sowohl in tierexperimentellen als auch in humanen Studien starke anti-inflammatorische und protektive Eigenschaften, da das Medikament pro-inflammatorische Zytokine und andere Entzündungsmarker wie das C-reaktive Protein (CRP) reduzierte [39]. Diese protektiven Effekte konnten nicht nur im Gehirn, sondern auch in verschiedenen anderen Organen beobachtet werden [39]. Die Mechanismen hinter den protektiven Eigenschaften von DEX sind jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass die protektiven Eigenschaften von DEX mit dem Signalweg der Autophagie assoziiert sind und vermutlich durch die Aktivierung des cholinergen anti-inflammatorischen Reflexes induziert werden [40-43].

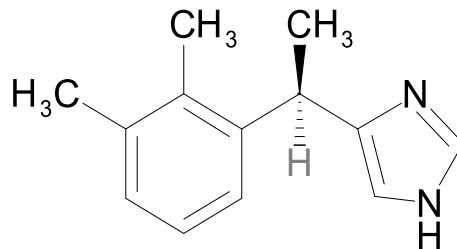


Abbildung 5: Chemische Struktur von Dexmedetomidin. Erstellt mit Chem4Word in Microsoft Word.

2.1.1 Fragestellung

In der Arbeitsgruppe der experimentellen Anästhesie der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin von Frau Prof. Dr. Spies wurde ein Tiermodell einer systemischen Inflammation entwickelt, um die Effekte einer präventiven DEX-Gabe zu untersuchen. In diesem Tiermodell der Ratte konnte bereits gezeigt werden, dass die präventive Gabe von DEX eine durch LPS-Injektion induzierte Neuroinflammation erfolgreich reduzierte [44]. Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, die möglichen Wirkmechanismen von DEX genauer zu untersuchen. Dazu wurde der Fokus auf das Gehirn und die Milz, als größtes lymphatisches Organ, gelegt. In beiden Organen wurde der Einfluss des Medikaments auf die Autophagie, Apoptose, sowie das cholinerge System im Kontext einer systemischen Inflammation untersucht, um zu analysieren, ob diese Prozesse mit den (neuro)-protektiven Effekten von DEX assoziiert sind. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersucht, inwiefern der Entzündungsreiz und/oder die DEX-Gabe miRNAs, die die Autophagie und/oder die Inflammation regulieren, beeinflusst.

2.2 Methodik

2.2.1 Tiermodell

Für diese Arbeit wurden insgesamt 94 drei Monate alte, adulte männliche Wistar-Ratten (250-300 g) untersucht, die unter einem 12-12 h Tag-Nacht-Zyklus bei Raumtemperatur ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) und konstanter Luftfeuchtigkeit (40-70 %) gehalten wurden. Die Tiere hatten einen *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter. Um ein Modell einer systemischen Inflammation zu generieren, wurde den Ratten nach einer kurzen, flachen Isofluran-Narkose 1 mg/kg Körpergewicht LPS intraperitoneal (i.p.) verabreicht und zusätzlich 10 min davor 5 µg/kg Körpergewicht Dexmedetomidin (dexdor®, Orion Pharma, Espoo, Finnland) oder 0,9%iges Natriumchlorid (NaCl) als Kontrollvehikel i.p. injiziert sowie einer Tiergruppe 5 µg/kg Körpergewicht Dexmedetomidin i.p. injiziert (Abb. 6) [1, 44]. Die Tiere dieser vier Gruppen wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (6 h, 24 h, und 7 d) unter einer tiefen Isofluran-Narkose durch eine transkardiale Herzpunktion getötet und mit PBS perfundiert. Anschließend wurde die Milz entnommen, der Hippocampus und Cortex präpariert, alle Organe in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Registrierungsnummer G 0145/13, 1. Juli 2013).

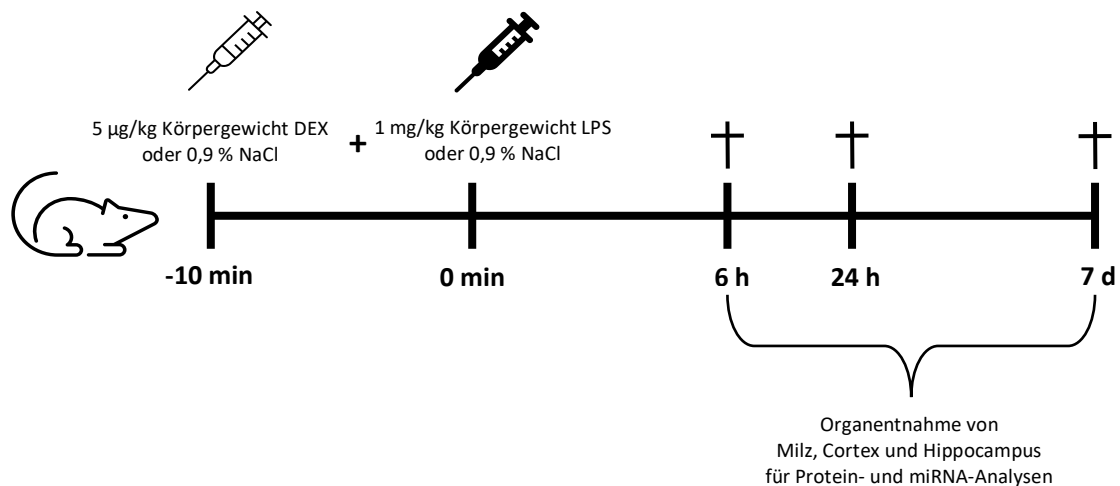


Abbildung 6: Versuchsablauf. Um den Einfluss von Dexmedetomidin (DEX) auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Inflammation zu untersuchen wurden vier experimentelle Gruppen erstellt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet. Um eine Inflammation zu generieren, wurde den Tieren der Inflammationsgruppe 1 mg/kg Körpergewicht LPS i.p. injiziert (LPS-Gruppe). Um den Einfluss von DEX auf die Inflammation zu untersuchen, erhielt die

Manteltext

Interventionsgruppe 10 min vor der LPS-Injektion eine Applikation von 5 µg/kg Körpergewicht DEX i.p. (DEX+LPS-Gruppe). Zusätzlich wurden zwei Kontrollgruppen erstellt, wobei eine Gruppe zwei Mal 0,9%iges NaCl in einem Abstand von 10 min i.p. injiziert wurde (NaCl-Gruppe) und einer weiteren Gruppe 5 µg/kg Körpergewicht DEX und 10 min später 0,9% NaCl i.p. appliziert wurde (DEX-Gruppe). Die Tiere dieser vier Gruppen wurden nach 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tagen getötet und die Milz, der Cortex und der Hippocampus für die Protein- und microRNA (miRNA)-Analysen entnommen. Erstellt mit Microsoft PowerPoint.

2.2.2 Proteinexpressionsanalysen mittels Western Blot

Für die Analysen auf Proteinebene wurden die zytosolischen Proteine aus Milz, Cortex und Hippocampus isoliert. Dazu wurden ca. 80-100 mg Gewebe in Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA)-Puffer, das zuvor mit Protease- (cOmplete™, Mini, EDTA-free, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und Phosphatase-Inhibitoren (PhosSTOP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) versetzt wurde homogenisiert und durch unterschiedliche Zentrifugationsschritte in eine nukleare, mitochondriale und zytosolische Fraktion unterteilt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Tests (Pierce® BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) quantitativ an einem Mikroplatten-Reader (Infinite M200, Tecan, Görding/Salzburg, Österreich) bestimmt. Für die anschließende Western Blot-Analyse wurden 20 µg Protein auf einem 10%igem Polyacrylamid-Gel getrennt und dann auf eine Nitrocellulosemembran mittels Semi-Dry-Verfahren transferiert. Nach einer 1-stündigen Blockade mit 5 % Milchpulver, wurden die primären Antikörper, die in 1X PBST mit 1 % Bovines Serumalbumin (BSA) gelöst wurden, über Nacht bei 4 °C inkubiert und nachfolgend die sekundären Horseradish Peroxidase (HRP)-konjugierten Antikörper, die in 1X PBST gelöst wurden, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte an einem Detektionssystem (FUSION SOLO S; Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland). Als internes Standardprotein zur Normalisierung wurde je nach Größe des Zielproteins β -Aktin oder β -Tubulin verwendet. Für die quantitative Analyse wurde das Dichteverhältnis vom Zielprotein zum Standardprotein gebildet und das normalisierte Dichteverhältnis der Kontrollgruppe als Referenz genutzt. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Manteltext

Tabelle 1: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper. Modifiziert nach Tabelle 1 aus [1].

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Antikörper	Verdünnung	Firma	Katalognummer
rabbit anti-Atg5	1:1.000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#12994
rabbit anti-SQSTM1/p62	1:1.000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#5114
rabbit anti-LC3A/B	1:1.000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#4108
rabbit anti-Bcl-2	1:1.000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#2870
rabbit anti-Cytochrome C	1:1.000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#11940
rabbit anti-PARP	1:1.000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#9542
rabbit anti-nicotinic Acetylcholine R alpha 7 / CHRNA7	1:1.000	Novus Biologicals, Abingdon, United Kingdom	#NBP1-79948
mouse anti-β-Actin-Peroxidase	1:50.000	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	#A3854
rabbit anti-β-Tubulin	1:1.000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#2128
goat anti-rabbit IgM-HRP	1:25.000	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA	#4020-05

2.2.3 miRNA-Expressionsanalysen

Die Auswahl der miRNA wurde aufgrund einer eingehenden Recherche der aktuellen Literatur getroffen. Anschließend wurden zunächst die entsprechenden Primerpaare mithilfe der Software *miRprimer* von Busk entworfen [45] und ein Funktionstest mittels SYBR-Green-basierter Real-Time-Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR) und Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Primerpaare, die keine Spezifität aufwiesen, wurden verworfen, sodass sechs verschiedene miRNAs (miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-30a-5p, miR-34a-5p, miR-205 und miR-Let-7a-5p) für die Analysen verwendet wurden. Für die Analysen wurde die Gesamt-RNA aus Milz, Cortex und Hippocampus mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert [46]. Dazu wurde ca. 50 mg des entsprechenden Gewebes entnommen, in Gefäße mit 800 µl peqGOLD RNAPure™ (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 1 mg Zirconium-Kügelchen transferiert und in einem FastPrep® (MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat kurz auf Eis inkubiert und dann mit 160 µL Chloroform versetzt. Für die Phasentrennung erfolgte erneut eine Inkubation auf Eis für 10 min und danach eine Zentrifugation bei 12.000 g für 5 min bei 4 °C. Die daraus resultierende obere wässrige Phase, die die RNA enthält, wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die RNA-Präzipitation wurde die RNA-haltige Lösung mit dem gleichen Anteil eiskaltem Isopropanol versetzt, für 15 min bei 4 °C

Manteltext

inkubiert und anschließend bei 12.000 g für 10 min zentrifugiert. Das daraus gewonnene Pellet wurde zwei Mal mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen und danach luftgetrocknet bevor es in 50 µL RNase-freiem PCR-Wasser resuspendiert und für 3 min bei 55 °C inkubiert wurde. Im Anschluss wurde mittels Spektralfotometer (NanoDrop™ 2000; Thermo Fisher Scientific™ Darmstadt, Deutschland) die RNA-Konzentration gemessen sowie die RNA-Qualität begutachtet und diese daraufhin bei -80 °C gelagert. Zur miRNA-Analyse wurden anschließend 500 ng RNA eingesetzt. Für die reverse Transkription wurde die Methode von Balcells et al. [47] verwendet und ein Mastercycler (vapo.protect, Eppendorf, Deutschland) eingesetzt. Für eine universelle reverse Transkription der gesamten miRNA wurde diese dazu mithilfe einer Poly-A-Polymerase (5 U/µl) polyadeniliert, um die RNA künstlich zu verlängern, und daraufhin mithilfe eines poly(T)-Primers (10 µM) und 200 U/µl Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transcriptase (Promega, Mannheim, Deutschland) revers transkribiert (42 °C, 60 min). Anschließend fand eine SYBR-Green basierte Real-Time-PCR-Messung der miRNAs mittels jeweils zwei miRNA-spezifischen DNA-Primern (2 µM) statt. Die gemessenen miRNA-Expressionen wurden anschließend quantitativ über die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode [48] analysiert. Zur Normalisierung wurde snoU6 als Referenz-RNA genutzt. Die genutzten Primer für die miRNA-Expressionsanalysen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Manteltext

Tabelle 2: Primersequenzen für die miRNA-Expressionsanalysen. Modifiziert nach Tabelle 2 aus [1].
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

miRNA	Primersequenz
miR-21-5p F-Primer R-Primer	5'-GCAGTAGCTTATCAGACTGATG-3' 5'-GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCAAC-3'
miR-27a-3p F-Primer R-Primer	5'-GCAGTTCACAGTGGCTAAG-3' 5'-CCAGTTTTTTTTTTTTTTTTCGCGGA-3'
miR-30a-5p F-Primer R-Primer	5'-GCAGTGTAACATCCTCGAC-3' 5'-TCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCTTCCA-3'
miR-34a-5p F-Primer R-Primer	5'-GCAGTGGCAGTGTCTTAG-3' 5'-GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTACAAC-3'
miR-204-5p F-Primer R-Primer	5'-CGCAGTTCCTTTGTCATC-3' 5'-CCAGTTTTTTTTTTTTTTTAGGCATAG-3'
miR-Let-7a-5p F-Primer R-Primer	5'-GCAGTGAGGTAGTAGGTTG-3' 5'-GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAACTATAC-3'
snU6RNA F-Primer R-Primer	5'-ATACAGAGAAGATTAGCATGGCC-3' 5'-CGAATTTGCGTGTATCCTTG-3'

2.2.4 Acetylcholin-Expressions- und Acetylcholinesterase-Aktivitätsanalysen

Für die Analyse der Acetylcholinesterase (AChE)-Aktivität und der ACh-Expression wurde das Amplex Red Acetylcholin-/Acetylcholinesterase-Assay-Kit (Invitrogen®, A1227, Karlsruhe, Germany) verwendet. Dieses Verfahren basiert darauf, dass die AChE-Aktivität indirekt, über den Fluoreszenzfarbstoff Resorufin, der durch eine Reaktion zwischen dem Amplex-Red-Reagenz (10-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazin), einer fluorogenen Sonde für H₂O₂, entsteht und mithilfe des Enzyms HRP mittels Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader quantitativ gemessen wird. Dabei wandelt das Enzym AChE das Substrat ACh in Cholin um, welches wiederum durch die Cholinoxidase zu Betain und H₂O₂ oxidiert. Das daraus entstandene H₂O₂ reagiert anschließend in Gegenwart von HRP in einer 1:1-Stöchiometrie mit Amplex-Red-Reagenz, sodass das stark fluoreszierende Produkt Resorufin entsteht. Für die Messung der AChE-Aktivität wurde ACh im Überschuss bereitgestellt; bei der Messung der ACh-Expression wiederum wurde AChE im Überschuss bereitgestellt. Für beide Messungen wurde zuvor eine

Manteltext

Standardkurve erstellt. Es wurden die zytosolischen Proteinfractionen aus Milz, Cortex und Hippocampus verwendet, welche für die ACh-Messung 1:25 und für die AChE Messung 1:75 mit 1x Reaktionspuffer verdünnt wurden. 50 µL der verdünnten Probe wurden mit 50 µL einer Reaktionslösung für ACh bzw. AChE versetzt und anschließend für 30 min kontinuierlich mittels Mikroplatten-Reader (Infinite M200, Tecan, Görding/Salzburg, Österreich) bei einer Anregung von 560 nm und Emissionsdetektion bei 590 nm gemessen.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der in dieser Arbeit geschilderten Analysen erfolgte mithilfe des Programms GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Dabei wurden die statistischen Unterschiede durch den nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test ermittelt und der Dunn-Test als Post-hoc-Analyseverfahren verwendet. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant definiert. Um monotone Korrelationen zu identifizieren, wurden die Daten mittels Spearman-Korrelation analysiert.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Der Einfluss von Dexmedetomidin auf die Expression von Autophagie-assoziierten Proteinen

Um mögliche Effekte von LPS und einer vorherigen DEX-Gabe auf den Autophagie-Prozess zu beobachten, wurden verschiedene Autophagie-assoziierte Proteine untersucht. Dazu wurden die Proteine Autophagy-related 5 (Atg5), Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)-II und Sequestosome 1 (SQSTM1)/p62 gemessen. Mit Atg5 und LC3-II konnten so mögliche Änderungen beider Konjugationssysteme während der Elongationsphase abgebildet und zusätzlich Informationen über den autophagischen Fluss gewonnen werden. Durch die Messung von LC3-II und SQSTM1/p62 konnten Hinweise über den korrekten Ablauf der Autophagie gewonnen werden [49]: Ein Anstieg von LC3-II ist mit einem Anstieg der Anzahl von Autophagosomen assoziiert, wohingegen SQSTM1/p62 am Ende des Autophagie-Zyklus abgebaut wird und daher ein Anstieg dieses Proteins gewöhnlich bei einer defekten Autophagie vermehrt aufzufinden ist [15].

Die Analysen auf Proteinebene zeigten, dass sowohl LPS als auch DEX keinen Einfluss auf die Autophagie-Proteine im Gehirn hatten, sie jedoch in der Milz zu Expressionsänderungen dieser Proteine führten (Abb. 7).

In der Milz konnte bei allen drei Behandlungsgruppen (LPS, DEX und DEX+LPS) ein signifikanter Anstieg in der Proteinexpression von Atg5 nach 6 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden. Nach 24 Stunden war dieser signifikante Anstieg weiterhin in der LPS-Gruppe zu beobachten und nach 7 Tagen führten sowohl die LPS- als auch die DEX+LPS-Injektion zu einer signifikant reduzierten Atg5-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 7 a). Zusätzlich führte die LPS-Injektion zu einem Anstieg der SQSTM1/p62-Expression nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontroll- und DEX+LPS-Gruppe, welche nicht unter der kombinierten Gabe von DEX+LPS beobachtet wurde (Abb. 7 g). Im Gegensatz dazu führte die DEX+LPS-Gabe zu einem signifikanten Anstieg in der LC3-II-Expression nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontroll- und LPS-Gruppe (Abb. 7 d). Die Messung von LC3-II und SQSTM1/p62 zeigte, dass LPS den

Manteltext

autophagischen Fluss beeinträchtigte und dass die DEX-Gabe dies nicht nur verhindern, sondern auch verstärkt anregen konnte.

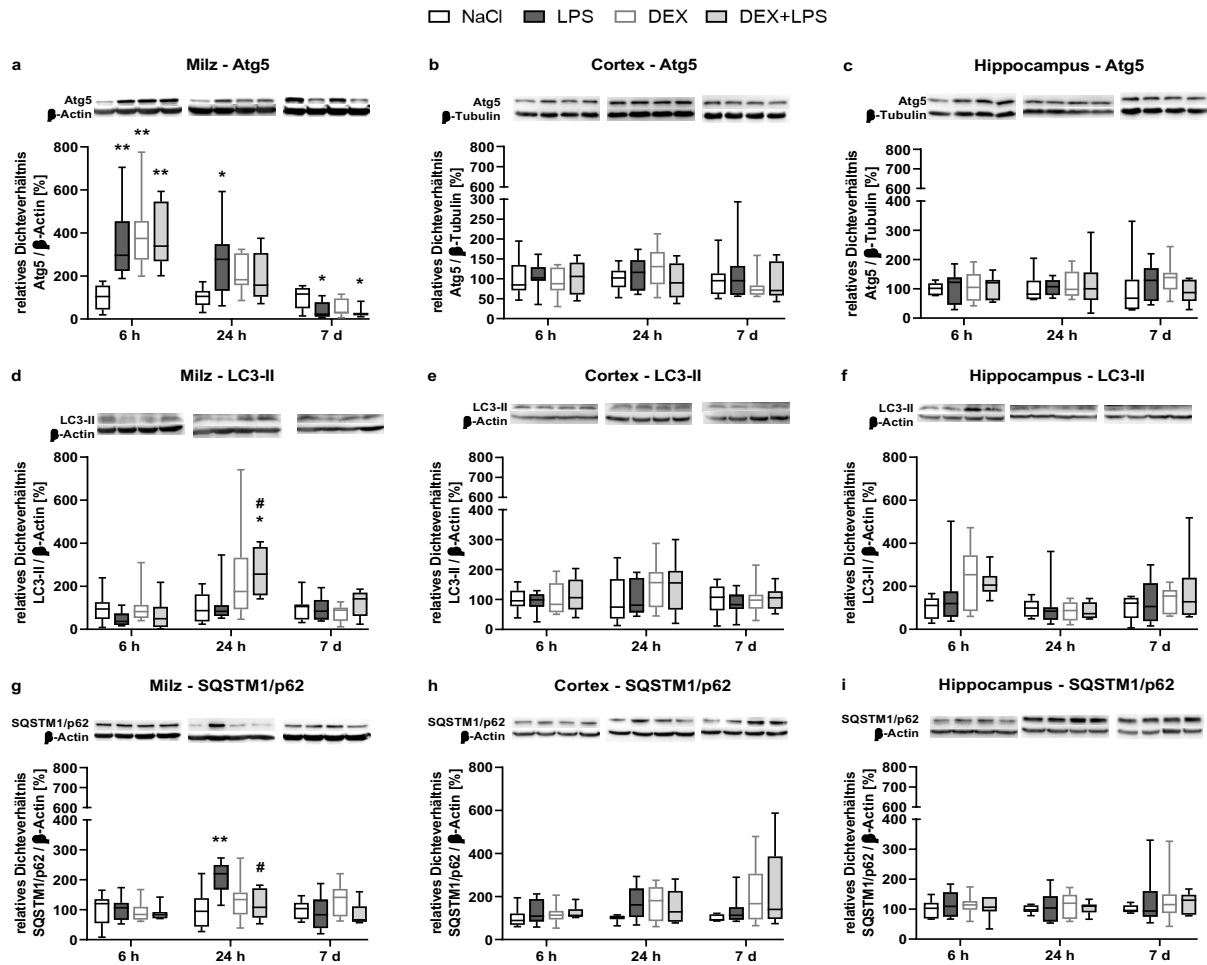


Abbildung 7: Der Einfluss von Dexmedetomidin (DEX) auf die Expression von Autophagie-assoziierten Proteinen nach Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Inflammation. LPS verändert die Autophagie auf Ebene der Proteinexpression in der Milz, aber nicht im Gehirn und eine Prävention mit DEX kann dies zum Teil in der Milz verhindern. Veränderungen in der Proteinexpression der Autophagie-assoziierten Proteine Autophagy-related 5 (Atg5) (a-c), Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)-II (d-f) und Sequestosome 1 (SQSTM1)/p62 (g-i) wurden in der Milz, dem Cortex und Hippocampus mittels Western Blot gemessen. Die Ergebnisse sind als Boxplots mit $n = 7-8$ Tieren pro Gruppe dargestellt und alle Daten auf die Expression der Kontrollgruppe (NaCl) normalisiert. Ein p -Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet, wobei * $p < 0,05$, ** und $p < 0,01$ vs. Kontrolle und # $p < 0,05$ vs. LPS kennzeichnet. Modifiziert nach Abb. 1 aus [1]. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

2.3.2 Der Einfluss von Dexmedetomidin auf die Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen

Da Autophagie und Apoptose eng miteinander verbunden sind [24], wurde zusätzlich der Einfluss von LPS und DEX auf pro- und anti-apoptotische Proteine untersucht. Als pro-apoptotische Marker wurden Cytochrom C und cleaved Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) gewählt, die freigesetzt werden, wenn zerstörte Mitochondrien bzw. zerstörte Zellkerne vorliegen [50, 51]. Als anti-apoptotischer Marker wurde B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) genutzt, das zur Stabilität der Mitochondrienmembran beiträgt, indem es Bcl-2 associated X protein (BAX) und andere pro-apoptotische Proteine hemmt und damit die Freisetzung von pro-apoptotischen Proteinen aus dem Inneren von Mitochondrien verhindert [51].

LPS und DEX hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinexpression von Cytochrom C, cleaved PARP und Bcl-2 im Gehirn, in der Milz aber veränderten sie die Expression dieser Proteine (Abb. 8). Die LPS-Injektion führte zu einem signifikanten Anstieg der Bcl-2-Expression nach 6 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe; und auch die alleinige DEX-Gabe führte zu einem ähnlich signifikanten Anstieg. Die DEX+LPS-Gruppe zeigte Tendenzen einer erhöhten Bcl-2-Expression. Nach 7 Tagen reduzierte sowohl die LPS- als auch die DEX- und DEX+LPS-Gabe die Bcl-2-Expression signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 8 a). Die LPS-Injektion führte hinsichtlich der pro-apoptotischen Proteine Cytochrom C und cleaved PARP sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der cleaved PARP-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Anstieg des pro-apoptotischen Spaltproduktes war bei einer Gabe von DEX in Kombination mit LPS (DEX+LPS) zu beiden Zeitpunkten nicht zu beobachten, was darauf hindeutet, dass DEX einen Anstieg der PARP-Spaltung abschwächen konnte.

Manteltext

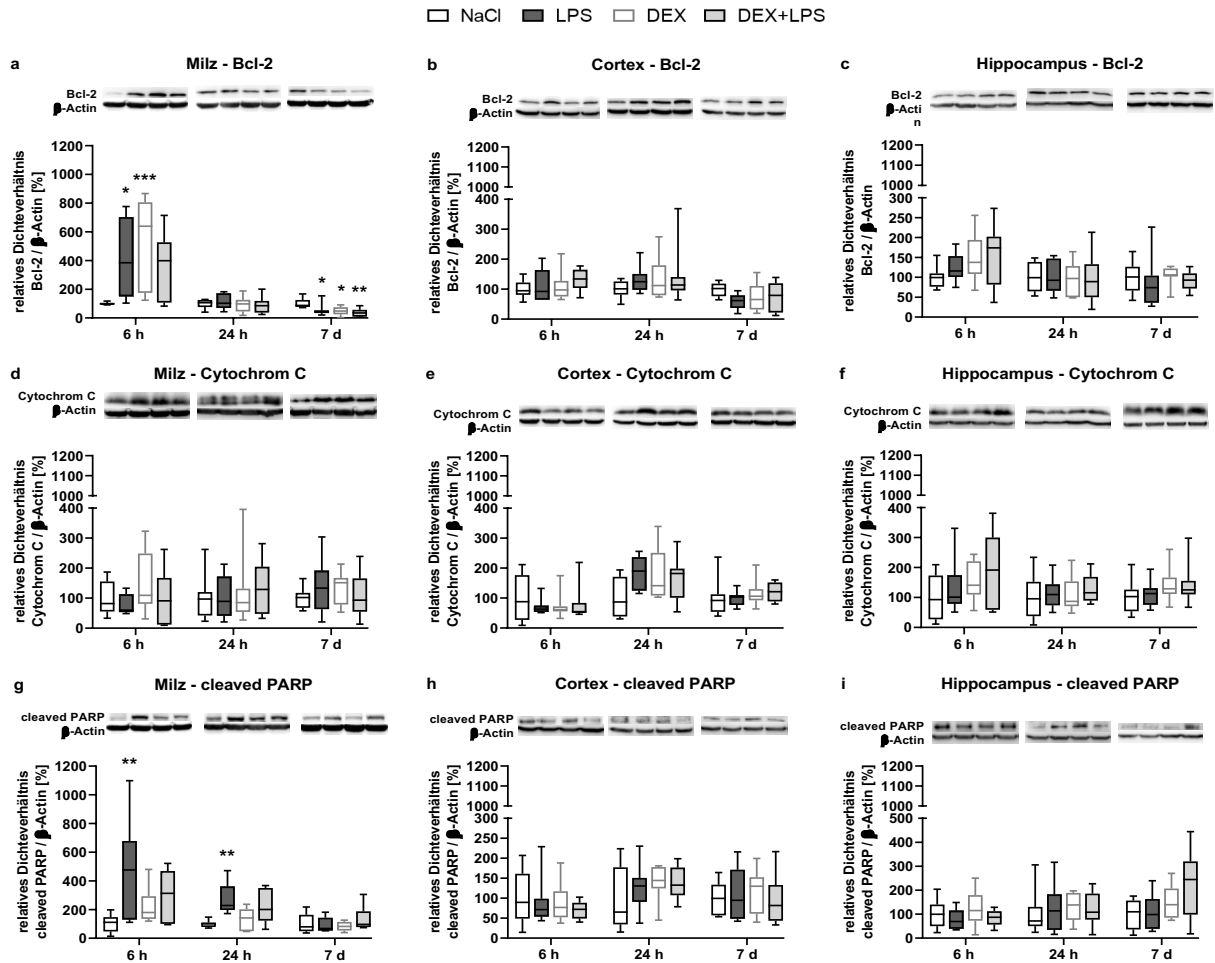


Abbildung 8: Der Einfluss von Dexmedetomidin (DEX) auf die Expression Apoptose-assoziiierter Proteine nach Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Inflammation. LPS erhöht die Spaltung von PARP in der Milz und die DEX-Gabe kann dies abschwächen. Veränderungen in der Proteinexpression der Proteine Bcl-2 (a-c), Cytochrom C (d-f) und cleaved PARP (g-i) wurden in der Milz, dem Cortex und Hippocampus mittels Western Blot detektiert. Die Ergebnisse sind als Boxplots mit $n = 7-8$ Tieren pro Gruppe dargestellt und alle Daten auf die Expression der Kontrollgruppe (NaCl) normalisiert. Ein p -Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet, wobei * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle kennzeichnet. Modifiziert nach Abb. 2 aus [1]. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Die Ergebnisse der Proteinanalysen haben demonstriert, dass die LPS-Injektion nicht nur den autophagischen Fluss in der Milz stört, sondern auch eine erhöhte PARP-Spaltung induziert und dass die DEX-Gabe den autophagischen Fluss wiederherstellen sowie die erhöhte PARP-Spaltung abschwächen kann. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem gestörten autophagischen Fluss und dem Anstieg der PARP-Spaltung in der Milz zu untersuchen, wurden daher Korrelationsanalysen nach Spearman durchgeführt. Diese zeigten eine positive monotone Korrelation zwischen cleaved PARP und SQSTM1/p62 nach 24 Stunden und deuten damit darauf hin, dass Störungen im

autophagischen Fluss mit einem erhöhten Anteil an gespaltenem PARP korrelieren (Abb. 9).

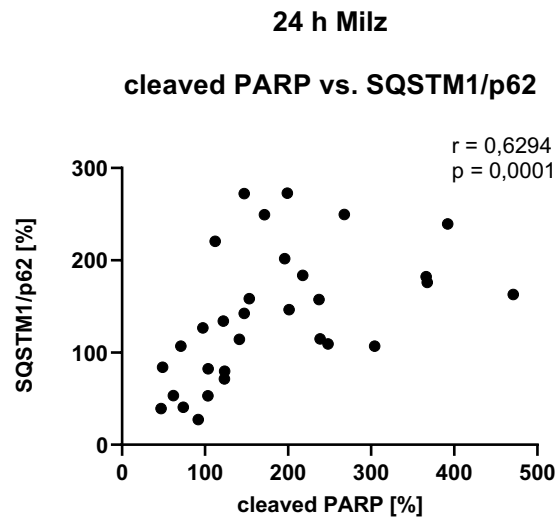


Abbildung 9: Korrelation zwischen cleaved Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) und Sequestosom 1 (SQSTM1)/p62. Nach 24 Stunden wiesen cleaved PARP und SQSTM1/p62 eine positive monotone Korrelation nach Spearman in der Milz auf ($r = 0,6294$; $p = 0,0001$). Die Ergebnisse sind als Streudiagramm dargestellt mit $n = 31$ Tiere. Ein p -Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Modifiziert nach Abb. 3 aus [1]. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

2.3.3 Der Einfluss von Dexmedetomidin auf die Expression von Autophagie- und Inflammations-assoziierten miRNAs

Um den Einfluss von LPS und DEX auf die untersuchten Autophagie- und Apoptose-relevanten Proteine genauer zu analysieren, wurde zudem die Expression verschiedener miRNAs untersucht, die diese Prozesse beeinflussen. Dafür wurden die miRNAs miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-30a-5p, miR-34a-5p, miR-204-5p und miR-Let-7a-5p in der Milz, im Cortex und im Hippocampus analysiert.

2.3.3.1 Veränderungen der miRNA-Expression in der Milz

In der Milz reduzierte LPS die Expression von miR-21-5p und miR-34a-5p nach 6 Stunden, sowie die Expression von miR-Let-7a-5p nach 24 Stunden und 7 Tagen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu führte die kombinierte DEX+LPS-Injektion (DEX+LPS) zu keiner reduzierten miR-21-5p- und miR-34a-5p-Expression und konnte zudem die miR-Let-7a-5p-Reduktion nach 7 Tagen verhindern (Abb. 10 a, d, f).

Manteltext

Neben LPS hatte auch die Gabe von DEX und DEX in Kombination mit LPS einen signifikanten Einfluss auf die Expression der miRNAs: Die alleinige DEX-Injektion reduzierte nach 6 Stunden die Expression fast aller miRNAs (außer miR-21-5p), nach 24 Stunden die Expression von miR-27a-3p, miR-204-5p und miR-Let-7a-5p und nach 7 Tagen die Expression von miR-21-5p im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die DEX+LPS-Gabe veränderte die Expression der miRNAs erst nach 24 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt erhöhte die DEX+LPS-Gabe die Expression von miR-34a-5p im Vergleich zur LPS-Gruppe und reduzierte die Expression von miR-Let-7a-5p im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem reduzierte die DEX+LPS-Gabe nach 7 Tagen die Expression von miR-21-5p im Vergleich zur Kontroll- und LPS-Gruppe und erhöhte die Expression von miR-30a-5p, miR-34a-5p, miR-204-5p und miR-Let-7a-5p im Vergleich zur LPS- sowie, im Falle von miR-34a-5p und miR-204-5p, auch im Vergleich zur Kontrollgruppe.

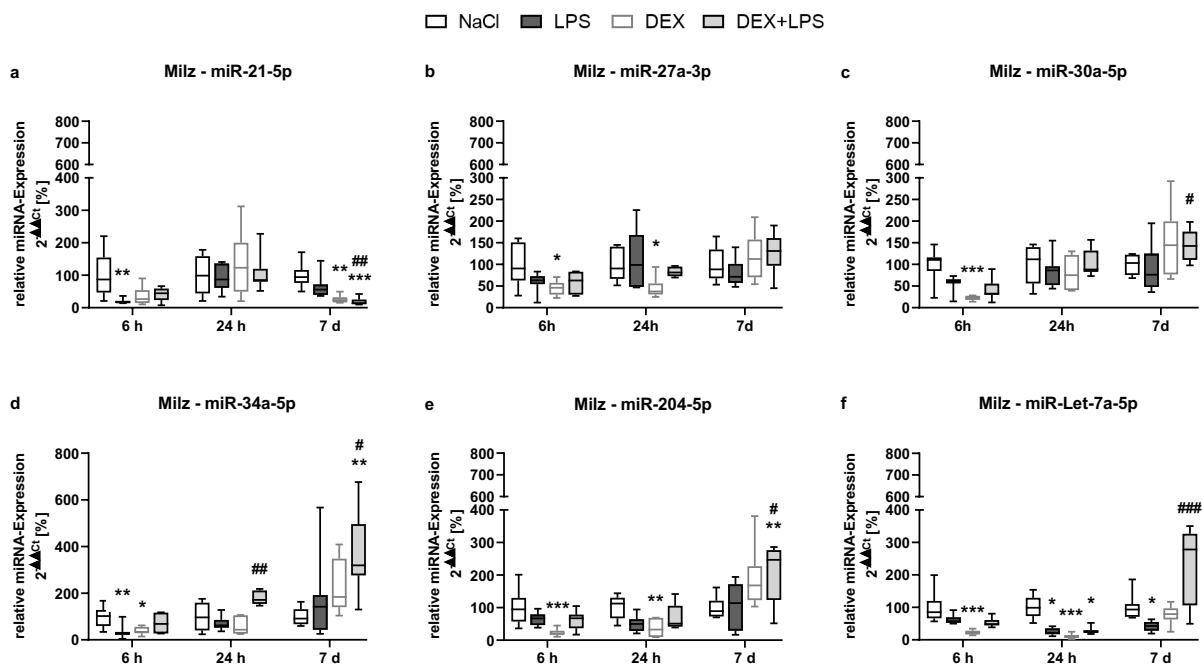


Abbildung 10: Der Einfluss von Dexmedetomidin (DEX) auf die microRNA (miRNA)-Expression in der Milz nach Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Inflammation. DEX verhindert die LPS-induzierte Reduktion der miR-Let-7a-5p-Expression und schwächt die Reduktion von miR-21-5p und miR-34a-5p ab. Veränderungen in der Genexpression von miR-21-5p (a), miR-27a-3p (b), miR-30a-5p (c), miR-34a-5p (d), miR-204-5p (e), miR-Let-7a-5p (f) wurden in der Milz mittels Real-Time-PCR gemessen und über die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode [48] quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Boxplots mit $n = 7-8$ Tieren pro Gruppe dargestellt und alle Daten auf die Expression der Kontrollgruppe (NaCl) normalisiert. Ein p -Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet, wobei * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle und # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ und ### $p < 0,001$ vs. LPS kennzeichnet. Modifiziert nach Abb. 4 aus [1]. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Manteltext

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den miRNAs und den Autophagie- und Apoptose-Markern zu finden, wurden auch hier Korrelationsanalysen nach Spearman durchgeführt. Diese zeigten, dass Änderungen in der miRNA-Expression keinen Einfluss auf die Expression der Autophagie-assoziierten Proteine hatten. Stattdessen wurden negative Korrelationen zwischen den miRNAs miR-21-5p, miR-34a-5p und miR-Let-7a-5p und der PARP-Spaltung detektiert: miR-21-5p und miR-34a-5p korrelierten nach 6 Stunden mit cleaved PARP ($r = -0,4427$; $p = 0,0126$ bzw. $r = -0,3702$; $p = 0,0404$) (Abb. 11 a, b) und miR-Let-7a-5p korrelierte nach 24 Stunden mit cleaved PARP ($r = -0,4081$; $p = 0,0227$) (Abb. 11 c) in der Milz, was darauf hindeutet, dass eine Reduktion dieser drei miRNAs durch LPS mit einer erhöhten PARP-Spaltung zusammenhängt.

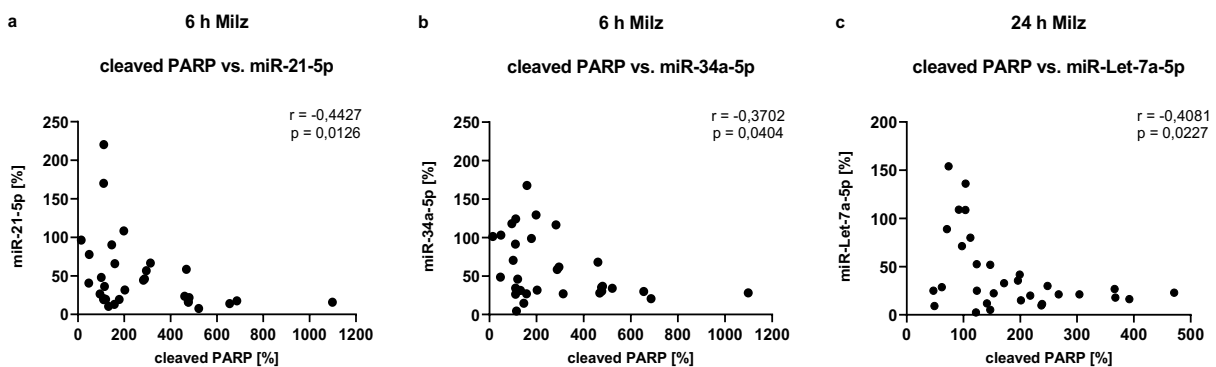


Abbildung 11: Korrelation zwischen cleaved Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) und verschiedenen microRNAs (miRNAs). Nach 6 Stunden wiesen cleaved PARP und miR-21-5p (a) bzw. miR-34a-5p (b) eine negative monotone Korrelation nach Spearman in der Milz auf ($r = -0,4427$; $p = 0,0126$ bzw. $r = -0,3702$; $p = 0,0404$) und nach 24 Stunden wiesen cleaved PARP und miR-Let-7a-5p (c) eine negative monotone Korrelation nach Spearman in der Milz auf ($r = -0,4081$; $p = 0,0227$). Die Ergebnisse sind als Streudiagramm dargestellt mit $n = 31$ Tiere. Ein p -Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Modifiziert nach Abb. 5 aus [1]. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

2.3.3.2 Veränderungen der miRNA-Expression im Cortex

Im Cortex führte die LPS-Injektion zu einer signifikanten Reduktion der miR-30a-5p-, miR-204-5p- und miR-Let-7a-5p-Expression nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die kombinierte DEX+LPS-Gabe (DEX+LPS) konnte dies nicht verhindern und zeigte eine ähnliche Reduktion dieser miRNAs (Abb. 12 c, e, f).

Zusätzlich zu LPS hatten auch die DEX- und DEX+LPS-Gabe erneut einen signifikanten Einfluss auf die miRNA-Expression: Nach 6 Stunden führte die DEX+LPS-Gabe zu einer Reduktion fast aller miRNAs (außer miR-34a-5p) im Vergleich zur Kontroll- und LPS-Gruppe und nach 24 Stunden zu einer Reduktion aller miRNAs im Vergleich zur

Manteltext

Kontrollgruppe, sowie im Fall von miR-21-5p auch im Vergleich zu LPS-Gruppe. Zusätzlich reduzierte die alleinige DEX-Gabe nach 24 Stunden die Expression von miR-21-5p. Nach 7 Tagen erhöhte die DEX+LPS-Gabe die Expression fast aller miRNAs (außer miR-30a-5p) im Vergleich zur LPS sowie im Fall von miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-34a-5p und miR-Let-7a-5p auch im Vergleich zur Kontrolle. Außerdem führte die alleinige DEX-Gabe auch zu einer erhöhten Expression von miR-27a-3p und miR-34a-5p nach 7 Tagen im Vergleich zur Kontrolle.

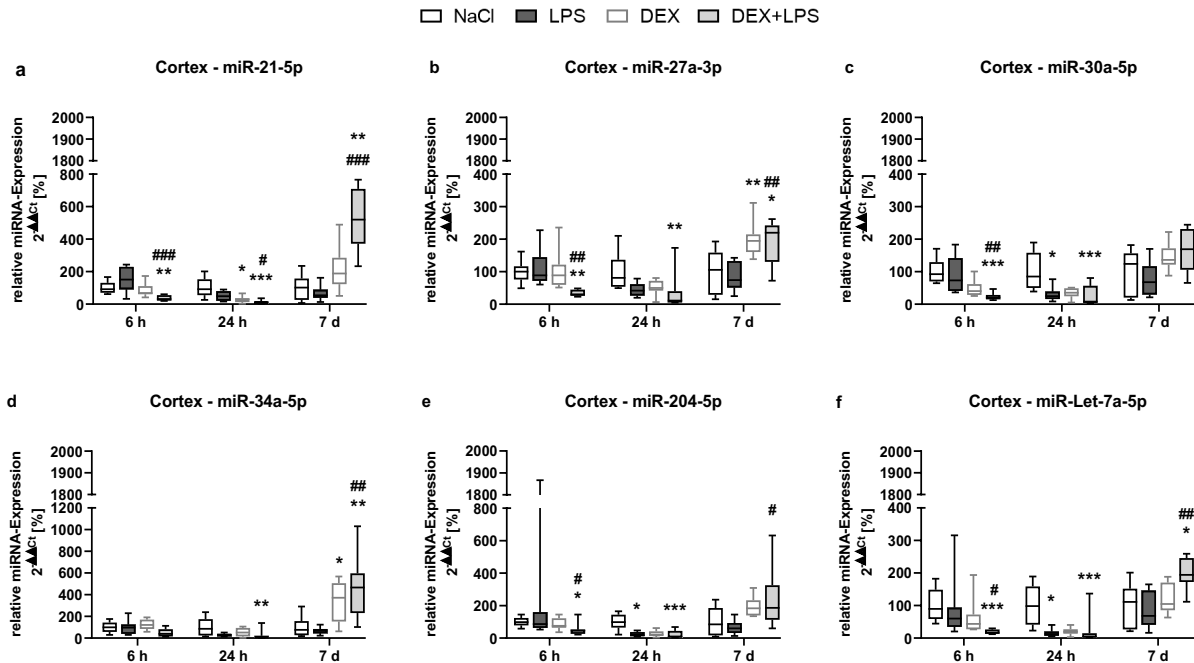


Abbildung 12: Der Einfluss von Dexmedetomidin (DEX) auf die microRNA (miRNA)-Expression im Cortex nach Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Inflammation. DEX kann die LPS-induzierte Reduktion der miR-30a-5p-, miR-204-5p und miR-Let-7a-5p nicht verhindern oder abschwächen. Veränderungen in der Genexpression von miR-21-5p (a), miR-27a-3p (b), miR-30a-5p (c), miR-34a-5p (d), miR-204-5p (e), miR-Let-7a-5p (f) wurden im Cortex mittels Real-Time-PCR gemessen und über die 2^{-ΔΔCT}-Methode [48] quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Boxplots mit n = 7-8 Tieren pro Gruppe dargestellt und alle Daten auf die Expression der Kontrollgruppe (NaCl) normalisiert. Ein p-Wert von < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet, wobei * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001 vs. Kontrolle und # p < 0,05, ## p < 0,01 und ### p < 0,001 vs. LPS kennzeichnet. Modifiziert nach Abb. 6 aus [1]. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

2.3.3.3 Veränderungen der miRNA-Expression im Hippocampus

Im Hippocampus erhöhte LPS signifikant die Expression von miR-30a-5p nach 6 Stunden und reduzierte die Expression von miR-21-5p sowie miR-204-5p nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombination aus DEX- und LPS-Injektion (DEX+LPS) verhinderte den LPS-induzierten Anstieg der miR-30a-5p-Expression nach 6 Stunden

Manteltext

und führte im Gegensatz zu LPS zu keiner reduzierten Expression von miR-21-5p und miR-204-5p nach 24 Stunden (Abb. 13 a, c, e).

Abgesehen von LPS hatten auch die DEX- und DEX+LPS-Gabe wieder einen signifikanten Einfluss auf die miRNA-Expression im Hippocampus: Nach 6 Stunden reduzierte die alleinige DEX-Gabe die Expression von miR-34a-5p und miR-204-5p im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24 Stunden reduzierte die DEX+LPS-Gabe die Expression von miR-30a-5p sowie miR-34a-5p im Vergleich zur Kontrolle und nach 7 Tagen reduzierte die alleinige DEX-Gabe die Expression aller miRNAs im Vergleich zur Kontrolle.

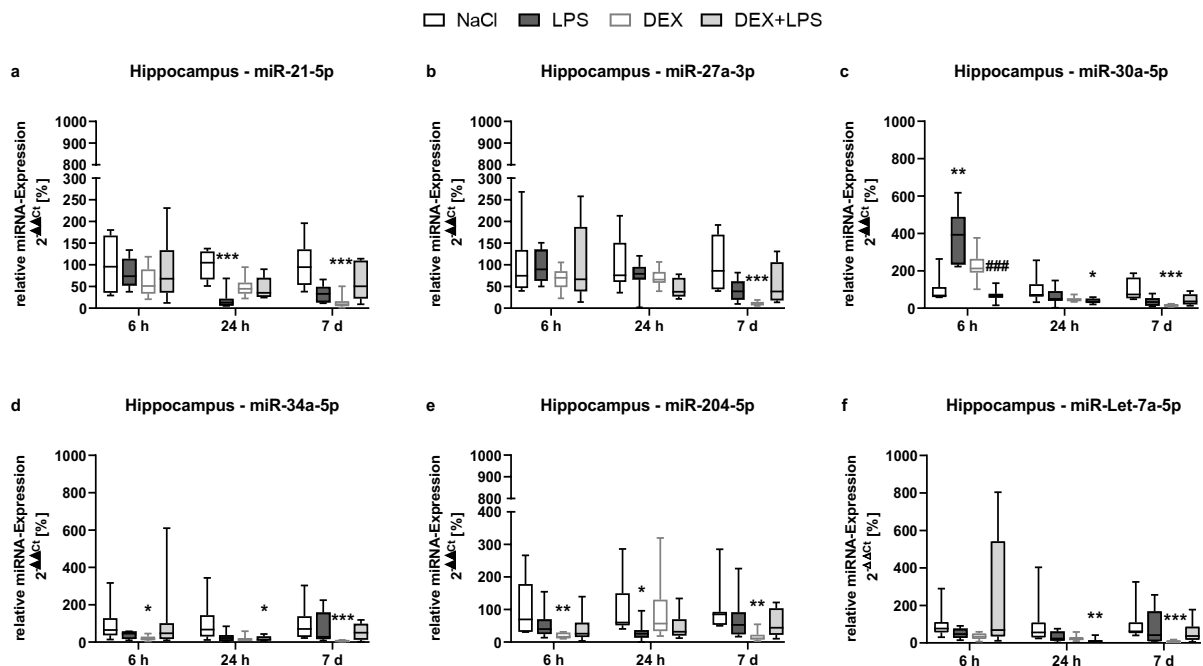


Abbildung 13: Der Einfluss von Dexmedetomidin (DEX) auf die microRNA (miRNA)-Expression im Hippocampus nach Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Inflammation. DEX verhindert die LPS-induzierte Erhöhung der miR-30a-5p-Expression und schwächt die LPS-induzierte Reduktion der miR-21-5p- und miR-204-5p-Expression ab. Veränderungen in der Genexpression von miR-21-5p (a), miR-27a-3p (b), miR-30a-5p (c), miR-34a-5p (d), miR-204-5p (e), miR-Let-7a-5p (f) wurden im Hippocampus mittels Real-Time-PCR gemessen und über die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode [48] quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Boxplots mit $n = 7-8$ Tieren pro Gruppe dargestellt und alle Daten auf die Expression der Kontrollgruppe (NaCl) normalisiert. Ein p -Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet, wobei $* p < 0,05$, $** p < 0,01$ und $*** p < 0,001$ vs. Kontrolle und $### p < 0,001$ vs. LPS kennzeichnet. Modifiziert nach Abb. 7 aus [1]. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

2.3.4 Der Einfluss von Dexmedetomidin auf die Expression von Acetylcholin und die Aktivität der Acetylcholinesterase

Da aktuelle Studien darauf hindeuten, dass der cholinerge anti-inflammatorische Reflex eine Rolle bei der DEX-vermittelten Protektion spielen könnte [52, 53] und da dieser Signalweg mit einer Aktivierung der Autophagie einhergeht [33], wurde auch untersucht, inwiefern LPS und DEX den cholinergen anti-inflammatorischen Reflex beeinflussen. Dazu wurde die Proteinexpression des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors, die Expression von ACh und die Aktivität von AChE in der Milz, dem Cortex und dem Hippocampus gemessen.

Weder LPS noch DEX veränderten die Proteinexpression von $\alpha 7$ nAChR (Abb. 14 a-c), doch beide Substanzen modifizierten die ACh-Expression und die AChE-Aktivität in der Milz und im Gehirn (Abb. 14 d-i).

2.3.4.1 *Veränderungen in der Acetylcholin-Expression und Acetylcholinesterase-Aktivität in der Milz*

In der Milz reduzierte LPS die ACh-Expression nach 24 Stunden signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Eine ähnlich signifikante Reduktion war auch unter der DEX- und DEX+LPS-Gabe zu beobachten (Abb. 14 d). Zudem hatte die alleinige DEX-Gabe bereits nach 6 Stunden Auswirkungen auf die ACh-Expression, da sie die ACh-Expression im Vergleich zur Kontrolle erhöhte.

Im Gegensatz zur ACh-Expression konnte LPS die AChE-Aktivität bereits nach 6 Stunden modifizieren, indem LPS die Aktivität dieses Enzyms nach 6 Stunden signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöhte (Abb. 14 g). Eine ähnliche Steigerung der AChE-Aktivität war auch unter der DEX- und DEX+LPS-Gabe sichtbar. Nach 24 Stunden waren jedoch keine Änderungen mehr durch die LPS-Injektion erkennbar. Aber unter der DEX- und DEX+LPS-Gabe zeigte sich hier weiterhin ein signifikanter Anstieg in der AChE-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle bzw. zur LPS-Gruppe, der nach 7 Tagen noch unter DEX+LPS-Gabe zu detektieren war.

Um zu ermitteln, welche Auswirkungen die AChE-Aktivität auf die ACh-Expression in der Milz hatte, wurden diese Daten mittels Spearman-Korrelation analysiert (Abb. 15 a-c). Sowohl nach 6 Stunden als auch nach 7 Tagen korrelierten die ACh-Expression und AChE-Aktivität positiv miteinander ($r = 0,475$; $p = 0,0007$ bzw. $r = 0,6202$; $p = 0,0002$) (Abb. 15 a, c). Nach 24 Stunden konnte jedoch keine Korrelation zwischen der AChE-

Aktivität und der ACh-Expression, weder positiv noch negativ, festgestellt werden, was den modulierenden Effekt von DEX auf die AChE-Aktivität zu diesem Zeitpunkt verdeutlicht (Abb. 15 b).

2.3.4.2 Veränderungen in der Acetylcholin-Expression und Acetylcholinesterase-Aktivität im Gehirn

Im Gehirn beeinflusste LPS die ACh-Expression im Cortex, nicht aber im Hippocampus (Abb. 14 e). Im Cortex induzierte die LPS-Injektion einen signifikanten Anstieg der ACh-Expression nach 24 Stunden sowie eine Reduktion nach 7 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine DEX-Gabe allein oder in Kombination mit LPS hatte keinen Einfluss auf die ACh-Expression.

Im Gegensatz zur ACh-Expression führten nur die DEX-Gabe (allein oder in Kombination mit LPS) zu signifikanten Veränderungen in der AChE-Aktivität in beiden Hirnregionen, nicht aber die alleinige LPS-Injektion (Abb. 14 h, i). Im Cortex reduzierten sowohl die DEX- als auch die DEX+LPS-Gabe die AChE-Aktivität signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Im Hippocampus war ein gegenteiliger Effekt zu beobachten; hier führte die DEX+LPS-Gabe zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle.

Manteltext

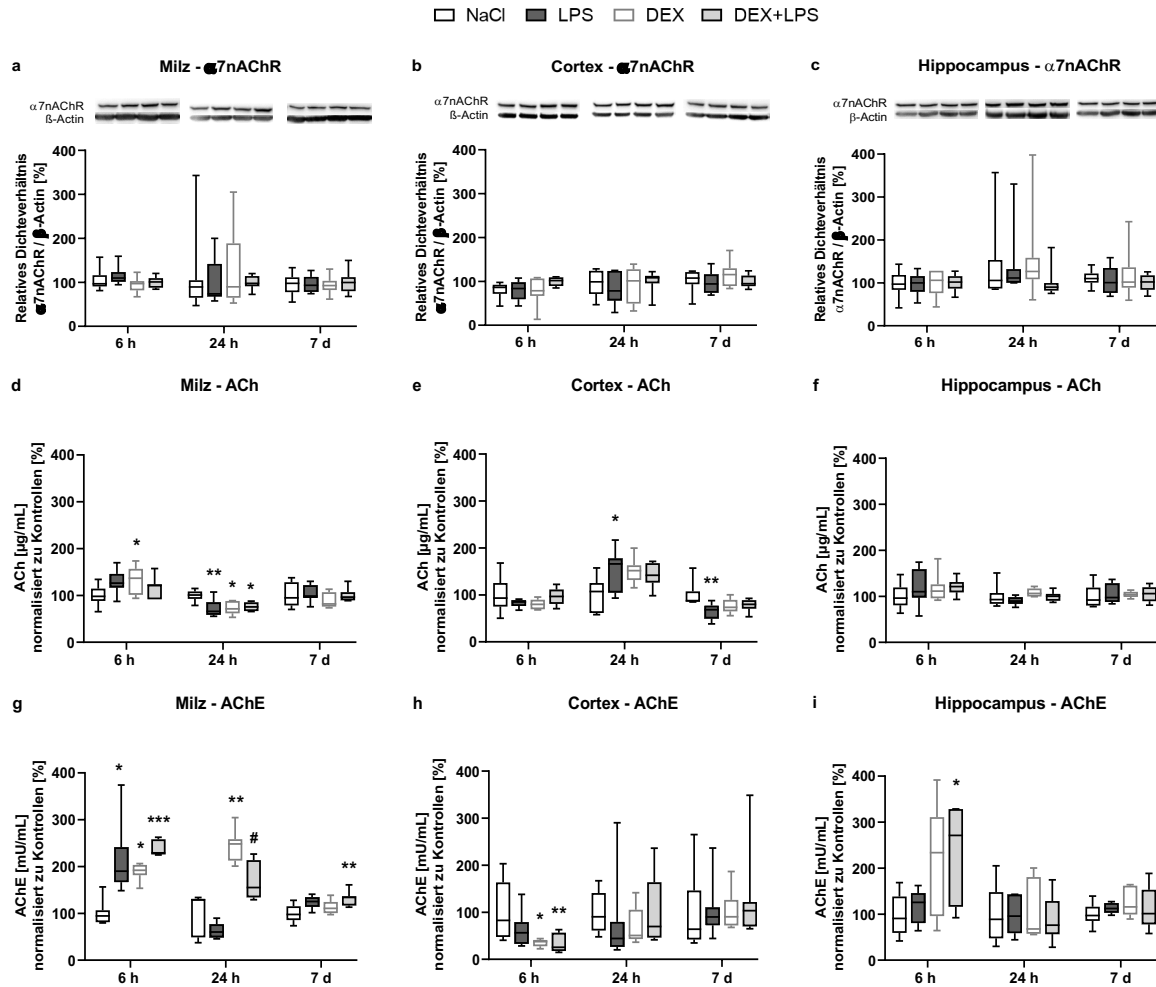


Abbildung 14: Der Einfluss von Dexmedetomidin (DEX) auf die Expression vom $\alpha 7$ nikotinischen Acetylcholinrezeptor ($\alpha 7nAChR$) und von Acetylcholin (ACh) sowie auf die Aktivität der Acetylcholinesterase (AChE) nach Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Inflammation. Sowohl LPS als auch DEX hatten keinen Einfluss auf die $\alpha 7nAChR$ -Expression (a-c), modifizieren aber die ACh-Expression (d-f) und AChE-Aktivität (g-i) in der Milz und im Gehirn. Die Expression von $\alpha 7nAChR$ wurde mittels Western Blot detektiert, die Expression von ACh und die Aktivität der AChE wurde mittels ACh-/AChE-Assay gemessen. Die Ergebnisse sind als Boxplots mit $n = 7-8$ Tieren pro Gruppe dargestellt und alle Daten auf die ACh-Expression bzw. die AChE-Aktivität der Kontrollgruppe (NaCl) normalisiert. Ein p -Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet, wobei * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle und # $p < 0,05$ vs. LPS kennzeichnet. Modifiziert nach Abb. 8 aus [1]. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Manteltext

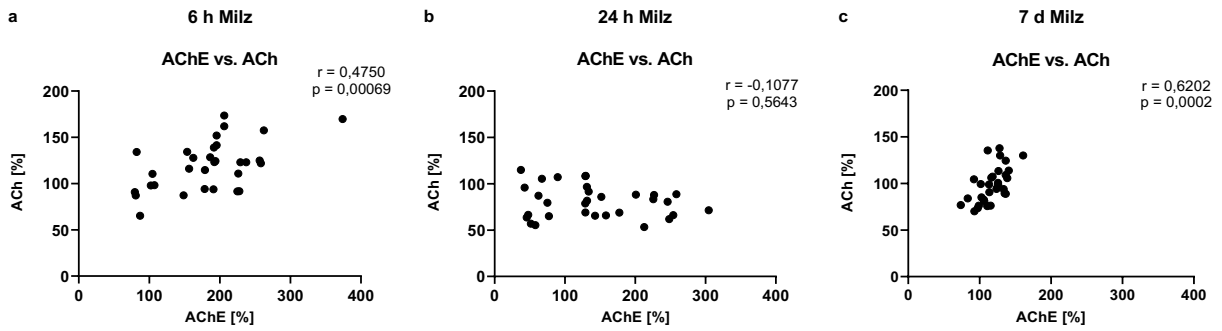


Abbildung 15: Korrelation zwischen Acetylcholinesterase (AChE) und Acetylcholin (ACh) in der Milz. Nach 6 Stunden (a) und 7 Tagen (c) wiesen AChE und ACh eine positive monotone Korrelation nach Spearman auf ($r = 0,4750$; $p = 0,00069$ bzw. $r = 0,6201$; $p = 0,0002$). Nach 24 Stunden wurde keine Korrelation zwischen AChE und ACh detektiert (b) ($r = -0,1077$; $p = 0,5643$). Die Ergebnisse sind als Streudiagramm dargestellt mit $n = 31-32$ Tiere. Ein p -Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Modifiziert nach Abb. 8 aus [1]. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

2.4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die zugrundeliegenden DEX-vermittelten Protektionsmechanismen nach LPS-induzierter systemischer Inflammation genauer zu untersuchen. Dabei lag ein besonderer Fokus auf dem Prozess der Autophagie, dem Zusammenhang zwischen Autophagie und Apoptose und dem cholinergen anti-inflammatorischen Reflex sowie der Regulation dieser Prozesse durch miRNAs.

Zuvor wurde in unserer Arbeitsgruppe in dem vorliegenden Tiermodell gezeigt, dass der systemisch wirkende Entzündungsreiz LPS zu einer erhöhten pro-inflammatorischen Zytokinlast im Gehirn führt und dass eine DEX-Gabe vor der LPS-Injektion dies verhindern kann [44]. Die Ergebnisse der gegenwärtigen Promotionsarbeit ergänzen nun diese Erkenntnisse, da diese die möglichen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen untersucht hat. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass (Abb. 16):

- I. LPS den autophagischen Fluss in der Milz beeinträchtigt und DEX die LPS-induzierten Störungen der Autophagie verhindern kann;
- II. LPS zu einer erhöhten PARP-Spaltung in der Milz führt, welche durch die DEX-Gabe abgeschwächt wurde;
- III. LPS in der Milz und im ZNS jeweils ein bestimmtes miRNA-Set modifizierte und diese Veränderungen mithilfe von DEX zum Teil verhindert bzw. abgeschwächt wurden; und dass DEX (allein und in Kombination mit LPS) einen regulierenden Effekt auf die miRNA-Expression in Milz, Cortex und Hippocampus hatte;
- IV. sowohl LPS als auch DEX einen modulierenden Einfluss auf die ACh-Expression und AChE-Aktivität hatten.

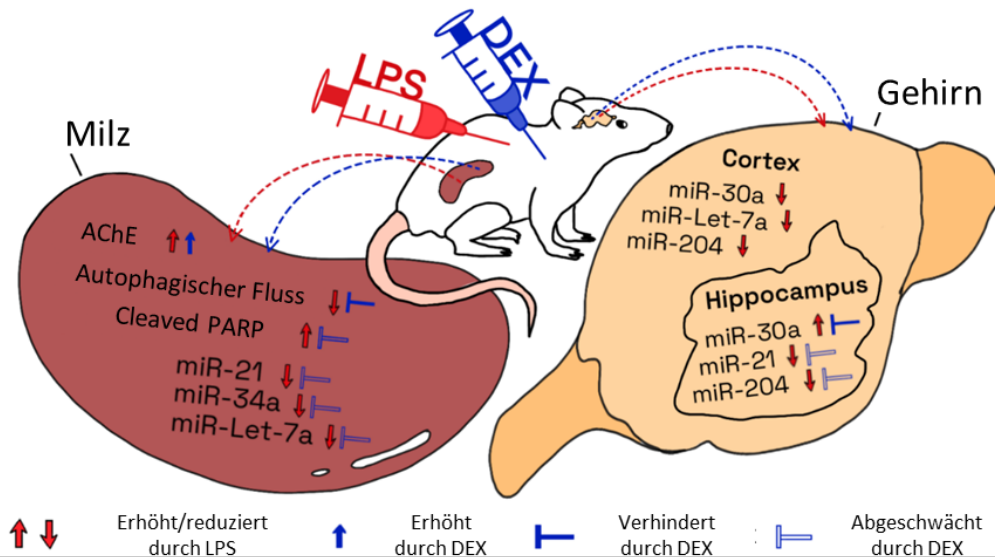


Abbildung 16: Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse. In der Milz führt eine Dexmedetomidin (DEX)-Gabe dazu, dass die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Störungen in der Autophagie verhindert sowie der LPS-induzierte Anstieg der PARP-Spaltung abgeschwächt wird und die Veränderungen der microRNA (miRNA)-Expression verhindert oder abgeschwächt werden. Im Gehirn führt eine Prävention mit DEX dazu, dass die Veränderungen der miRNA-Expression im Hippocampus verhindert oder abgeschwächt werden. Modifiziert nach Graphical Abstract aus [1]. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

2.4.1 Autophagie und Apoptose

Aufgrund der zentralen Rolle der Autophagie im Gehirn und Immunsystem sowie der engen Beziehung zwischen Autophagie und Apoptose [24], wurde ein besonderer Fokus auf die Untersuchung dieser Prozesse im Gehirn und in der Milz gelegt. Da die Autophagie ein kontinuierlicher, immer aktiver Prozess ist, wurden die zu untersuchenden Proteine so ausgewählt, dass möglichst verschiedene Schritte des Autophagie-Zyklus analysiert werden konnten. Dazu wurden auf Proteinebene beide Konjugationssysteme analysiert, indem das Protein Atg5 und das Protein LC3-II gemessen wurde und zusätzlich der autophagische Fluss durch die Analyse von LC3-II und dem Protein SQSTM1/p62 untersucht [49]. Ferner wurden Apoptose-Prozesse anhand der Proteine cleaved PARP, Cytochrom C und Bcl-2 analysiert. Cleaved PARP eignet sich gut als Apoptose-Marker, da eine PARP-Spaltung stattfindet, wenn dieses nukleäre DNA-reparierende Enzym durch Apoptose-induzierende Caspasen gespalten wird [50]. Zusätzlich wurde Cytochrom C ausgewählt, um die Art der Apoptose zu bestimmen. Dieses Protein kann bei einer Mitochondrien-abhängigen Apoptose im Zytosol detektiert werden, da bei dieser Art der Apoptose eine Beteiligung der Mitochondrien vorliegt bei

der das in Mitochondrien lokalisierte Cytochrom C in das Zytosol freigesetzt wird [51]. Um auch anti-apoptotische Mechanismen zu analysieren, wurde außerdem die Expression des Enzyms Bcl-2 gemessen, das die Mitochondrienmembran stabilisiert und so die Freisetzung von pro-apoptotischen Proteinen aus dem Inneren von Mitochondrien verhindert [51].

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine einmalige i.p. Gabe von 1 mg/kg Körpergewicht LPS keinen Einfluss auf die untersuchten autophagischen sowie pro- und anti-apoptotischen Proteine im Gehirn hatte. Im selben Tiermodell konnte zuvor gezeigt werden, dass die systemisch wirkende LPS-Injektion zu zerebralen Veränderungen der Zytokinspiegel führte [44], sodass die Vermutung nahe lag, auch Veränderungen von Autophagie- und Apoptose-relevanten Proteinen zu detektieren. Ein ähnliches Tiermodell der Arbeitsgruppe, bei der eine LPS-Gabe mit einer Operation kombiniert wurde, zeigte Veränderungen von Autophagie- und Apoptosesignalwegen im Gehirn der Tiere [54]. Eine Kombination von *damage associated molecular patterns* (DAMPs) und *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) wirkte hier vermutlich synergistisch, da eine alleinige Stimulation mit PAMPs (z.B. 1/mg/kg LPS) bzw. DAMPs (z.B. Laparotomie) zu keinen apoptotischen oder autophagischen Veränderungen im Gehirn führte. Ferner muss bei Vergleichen von Tiermodellen auch beachtet werden, dass die hier verwendete LPS-Dosis moderat war und eine leichte Entzündung induzierte. Andere Studien mit einem ähnlichen Ansatz haben eine deutliche höhere LPS-Dosis verwendet [8, 55, 56].

Im Gegensatz zum Gehirn, führte die LPS-Injektion in der Milz jedoch zu Veränderungen von Autophagie- und Apoptose-relevanten Proteinen. In Anbetracht der zentralen Rolle der Milz innerhalb des Immunsystems können durch Untersuchungen der Autophagie innerhalb der Milz Hinweise über die Autophagie der Immunzellen gewonnen werden. Die Milz, als größtes lymphatisches Organ, beherbergt eine Reihe verschiedener Immunzellen [57]. Diese Arbeit zeigte, dass sowohl LPS als auch DEX einen Einfluss auf die Expression von Atg5 in der Milz haben, ein Protein, das in die anfängliche Bildung einer autophagischen Membran involviert ist. Ein funktionierender autophagischer Fluss, gemessen an der Expression von LC3-II und SQSTM1/p62, wurde durch die LPS-Gabe blockiert und konnte durch eine Vorbehandlung mit DEX wiederhergestellt werden. Die Konversion von zytosolischem LC3-I zu membran-gebundenem LC3-II, die stattfindet, wenn LC3 an die Autophagie-Membran angelagert wird, wird als Zeichen für eine

vermehrte Bildung von Autophagosomen interpretiert. In Kombination mit dem LC3-bindenden Protein SQSTM1/p62, das am Ende des Autophagie-Zyklus während der Degradationsphase zusammen mit dem zu verwertendem Zellmaterial im Inneren des Autophagosomes abgebaut wird, kann die Messung von LC3-II und SQSTM1/p62 als Indikator für einen funktionierenden autophagischen Fluss genutzt werden [49]. Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit verdeutlichen, dass DEX Störungen im autophagischen Fluss wiederherstellen kann. Die zentrale Rolle einer funktionierenden Autophagie wurde auch in anderen Studien betont. So wurde gezeigt, dass eine defekte Autophagie im Beisein von LPS zu einer erhöhten pro-inflammatorischen Zytokinproduktion sowie zu einer erhöhten Mortalität führt. Eine pharmakologische Aktivierung der Autophagie konnte dies hingegen verhindern [20, 58]. Der Autophagie-modulierende Effekt von DEX in der Milz könnte auch die Beobachtungen von Liu und Kollegen erklären. Die Autoren zeigten, dass eine präventive DEX-Gabe in einem LPS-induzierten Sepsismodell in Mäusen die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in der Milz verhinderte [59]. Der Autophagie-induzierende Effekt von DEX wurde auch in anderen Organen beobachtet. Dabei erhöhte DEX die Autophagie in der Niere [60] sowie im Herzen [61] und inhibierte die Autophagie in der Lunge [43].

Neben der Autophagie spielt auch die Apoptose von Immunzellen eine bedeutende Rolle, da eine erhöhte Apoptoserate in Immunzellen ein Kennzeichen der Sepsis und einer fehlgeleiteten Immunreaktion ist [62]. Daher ist eine Prävention dieses Geschehens eine wichtige therapeutische Option. Unsere Ergebnisse zeigten, dass LPS in der Milz zu einer signifikant erhöhten Expression des Apoptose-Markers cleaved PARP innerhalb der ersten 24 Stunden führt. Eine vorherige DEX-Gabe lies diesen Marker nicht signifikant ansteigen und konnte somit die PARP-Spaltung abschwächen. Zusätzlich zeigte die Promotionsarbeit, dass die LPS-induzierten Zelltodmechanismen vermutlich Mitochondrien-unabhängig waren, da keine Änderungen in der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol detektiert wurden. Die anti-apoptotischen Eigenschaften von DEX wurden auch in anderen Studien in der Milz [63] sowie in anderen Organen beobachtet [10, 64, 65]. Dieses Medikament bietet daher einen vielversprechenden Ansatz für die Organprotektion während inflammatorischer Ereignisse.

Da Autophagie und Apoptose in enger Beziehung zueinander stehen und sich gegenseitig inhibieren und induzieren, können Defekte in der Autophagie auch zum Zelltod führen [24]. Eine Akkumulation von SQSTM1/p62 beispielsweise wird oft bei Störungen der Autophagie beobachtet [12]. Auch in diesem Tiermodell wurde eine erhöhte SQSTM1/p62-Expression nach LPS-Injektion in der Milz gemessen und die SQSTM1/p62-Expression korrelierte mit der PARP-Spaltung nach 24 Stunden. Dies deutet darauf hin, dass Störungen im autophagischen Fluss mit einem verstärkten Zelltod in der Milz assoziiert sein könnten und dass DEX durch seine Autophagie-induzierenden Eigenschaften möglicherweise protektiv auf die Milz und regulierend auf dort ansässige Immunzellen wirken kann.

2.4.2 Regulation durch miRNAs

Maßgeblich verantwortlich für die posttranslationalen Modifikationen sind miRNAs. Diese kleinen regulatorische RNAs können die Proteinexpression verändern, indem sie die Translation inhibieren, zu einer Degradation der mRNA führen, oder aber die Translation aktivieren [26, 28]. Sowohl Autophagie, Apoptose als auch die Immunantwort können durch miRNAs moduliert werden [66, 67]. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern Autophagie-modulierende miRNAs durch LPS und DEX verändert werden und wie sich diese Veränderung auf die Proteinexpression auswirkt. Dazu wurde die Expression von sechs miRNAs (miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-30a-5p, miR-34a-5p, miR-204-5p sowie miR-Let-7a-5p) untersucht. Dabei inhibieren miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-30a-5p, miR-34a-5p und miR-204-5p unterschiedliche Prozesse während der Autophagosombildung [68-77], wohingegen miR-Let-7a-5p die Autophagie verstärkt [78]. miR-21 inhibiert die Autophagie, indem es das mammalian Target of Rapamycin (mTOR) aktiviert, welches die Initiation der Autophagie inhibiert [68]. miR-27a-3p hingegen besitzt verschiedene autophagische Zielmoleküle, wie Forkhead-Box-Protein O3 (FoxO3a) [69], Autophagy-related 7 (ATG7) [70] und PTEN-induced kinase 1 (PINK1) [71], die durch diese miRNA inhibiert werden. Auch miR-30a und miR-204 können die Autophagie an verschiedenen Stellen blockieren, da beide miRNAs sowohl die Initiation (Beclin-1) als auch den Elongationsprozess (ATG5, LC3) der Autophagie unterdrücken [75, 76]. miR-34a inhibiert Autophagy-related 9 (ATG9), ein wichtiges Transmembranprotein der Autophagie [72, 73]. Im Gegensatz dazu wurde bei einer Überexpression von miR-Let-7a ein Anstieg der Autophagie beobachtet [78].

Unsere Analysen der miRNA-Ebene zeigten, a) dass LPS in jedem Gewebe die Expression eines bestimmten Sets an miRNAs veränderte, b) dass DEX die LPS-induzierten miRNA-Veränderungen in der Milz und im Hippocampus verhindern bzw. abschwächen konnte, dies jedoch nicht im Cortex möglich war und c) dass die Änderungen der miRNA-Expression durch LPS und DEX in keinem Zusammenhang mit den jeweiligen Änderungen von Proteinen des Autophagie-Signalwegs standen.

Neben den Funktionen innerhalb der Autophagie, wurden die hier untersuchten miRNAs auch im Zusammenhang mit der Inflammation beschrieben. Dabei werden miR-21, miR-27a, miR-34a und miR-Let-7a anti-inflammatorische Eigenschaften [27, 66, 79, 80] und miR-30a sowie miR-204 pro-inflammatorische/-apoptotische Eigenschaften zugeschrieben [74, 77]. miR-21 ist ein essentieller Modulator der Inflammation, da es in aktivierten Immunzellen hochreguliert wird, um die Inflammationsreaktion zu beenden [79]; miR-27a kann die Expression von Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) verhindern und damit die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen inhibieren [81]. Auch miR-34a reduziert verschiedene pro-inflammatorische Zytokine und grenzt die pro-inflammatorische Immunantwort ein, indem es an Notch1 bindet [80]; miR-Let-7a stellt einen negativen Rückkopplungsmechanismus zur Eindämmung der Entzündung bereit [66]. Im Gegensatz dazu haben Studien gezeigt, dass eine Überexpression von miR-30a in Mikroglia-Zellen zu einer Erhöhung pro-inflammatorischer Marker sowie zu einer Reduktion anti-inflammatorischer Marker führte [82] und dass eine Inhibierung von miR-204 deutlich das Caspase-3-Level in einem Modell für Rückenmarksverletzungen in der Ratte verringerte [77].

In der Milz reduzierte LPS hauptsächlich die Expression der anti-inflammatorischen miRNAs miR-21-5p, miR-34a-5p und miR-Let-7a-5p, die eine vorherige DEX-Gabe hingegen abschwächen bzw. sogar verhindern konnte. Die Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass DEX das Abklingen der Inflammation durch die Modulation anti-inflammatorischer miRNAs in der Milz beschleunigen kann. Da diese miRNAs auch negativ mit der Expression von cleaved PARP korrelierten, suggerieren die Ergebnisse, dass diese miRNAs die Milz auch vor Apoptose geschützt haben könnten. Im Gehirn hingegen verdeutlichten die miRNA-Analysen, dass LPS je nach Gehirnareal sehr unterschiedliche Einflüsse auf die miRNA-Expression hatte. Während LPS im

Hippocampus sowohl anti-inflammatorische miRNAs reduzierte als auch pro-inflammatorischer miRNAs erhöhte, führte LPS im Cortex hauptsächlich zu einer Reduktion der miRNA-Expression – unabhängig davon, ob diese anti- oder pro-inflammatorischer Natur waren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die LPS-induzierten Veränderungen der miRNA-Expression im Hippocampus schädlicher als im Cortex waren, dass aber eine Prävention mit DEX diese LPS-vermittelten Veränderungen im Hippocampus auch abschwächen bzw. verhindern konnte, wohingegen dies im Cortex nicht möglich war.

Zusätzlich zur alleinigen LPS-Injektion, veränderte auch die alleinige Gabe von DEX sowie von DEX in Kombination mit LPS die Expression aller gemessenen miRNAs in der Milz und im Gehirn. Dabei war der Einfluss von DEX auf die miRNA-Expression bis zu 7 Tage nach der Verabreichung sichtbar, was verdeutlicht, dass DEX eine langanhaltende, nachhaltige Wirkung hatte, die über den alleinigen Effekt des Medikaments hinausging. Denn mit einer Halbwertszeit von ca. 2 Stunden wird DEX relativ schnell metabolisiert [83]. Außerdem war der Einfluss von DEX auf die miRNA-Expression im Gegensatz zu LPS nicht primär repressiv, sondern führte oftmals und dabei vor allem in Kombination mit LPS auch zu einem Anstieg vieler miRNAs nach 7 Tagen. Dieser späte DEX-induzierte Anstieg der miRNAs könnte auch ein Indikator für die anti-inflammatorischen Eigenschaften von DEX sein. Eine Studie von Silva und Kollegen zeigte, dass die Expression vieler miRNAs nach einer Verletzung anfänglich runterreguliert, jedoch während der Resolution der Inflammation wieder hoch reguliert wird [84]. Der Anstieg der miRNA-Expression in der DEX+LPS-Gruppe deutet darauf hin, dass DEX das Abklingen der Entzündung durch die Hochregulation entsprechender miRNAs fördern könnte. Allerdings wurden nicht nur anti-inflammatorische miRNAs sondern auch pro-inflammatorische miRNAs hochreguliert. Zudem zeigte die alleinige DEX-Gabe vor allem im Hippocampus oft eine Reduktion der miRNAs nach 7 Tagen, was darauf hindeutet, dass DEX in Abwesenheit eines Schadens auch negative Effekte haben könnte. Ferner wurden vor allem im Gehirn durch die DEX- oder DEX+LPS-Gabe gewisse Expressionsmuster beobachtet, die suggerieren, dass DEX im Gehirn Faktoren beeinflusst hat, die allen gemessenen miRNA gemeinsam vorgelagert waren.

Der Einfluss von DEX auf die in dieser Arbeit untersuchten miRNAs ist bis dato noch kaum erforscht und vorhandene Studien konzentrierten sich hauptsächlich auf das

Nervensystem, nicht aber auf die Milz. Dabei zeigten sie aber ähnliche Ergebnisse wie diese Arbeit – nämlich, dass DEX die Expression anti-inflammatorischer miRNAs, wie miR-27a-3p [85] oder miR-Let-7a [86] hochregulieren kann. Zudem gibt es auch Ergebnisse zu miR34a, die eine verminderte Expression im Hippocampus [87] sowie eine erhöhte Expression im Rückenmark durch DEX zeigten [88], was die gewebespezifische Funktion und Expression verschiedener miRNAs betont. Ausblickend bleibt zu sagen, dass die Regulation von miRNAs durch DEX sehr komplex ist und die Forschung auf diesem Gebiet noch am Anfang steht. Eine detailliertere Erforschung der Wirkungsweise von DEX könnte zum Verständnis der Zusammenhänge von Autophagie, Apoptose und miRNAs im Rahmen einer Entzündungsreaktion beitragen.

2.4.3 Cholinerges System

Neben dem Einfluss von DEX auf das Autophagie- und Inflammationsgeschehen wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss auf das cholinerge System untersucht, um Informationen über eine mögliche Beteiligung des cholinergen anti-inflammatorischen Reflexes zu gewinnen. Dieser Signalweg spielt eine essenzielle Rolle bei der Eindämmung von Entzündungsreaktion, wobei der $\alpha 7nAChR$ dabei eine tragende Rolle einnimmt, da eine Aktivierung des $\alpha 7nAChR$ die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine hemmt [30, 31]. Im Gegensatz zu anderen Studien beeinflussten aber weder LPS noch DEX die Expression des $\alpha 7nAChR$ [89, 90]. In diesen Studien wurde für DEX ein induzierender Effekt auf die $\alpha 7nAChR$ -Expression gezeigt, wohingegen der Schaden selbst (z.B. LPS, Cecal Ligation Puncture (CLP) oder Spinal Cord Injury (SCI)) in diesen Modellen zu unterschiedlichen Ergebnissen führte. Es wurden sowohl erhöhende [90] als auch reduzierende Effekte auf die $\alpha 7nAChR$ -Expression beobachtet [91, 92]. Diese gegensätzlichen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Rolle des $\alpha 7nAChR$ noch genauer im Zusammenhang mit inflammatorischen Reizen erforscht werden muss.

Im Gegensatz zu $\alpha 7nAChR$ konnten sowohl LPS als auch DEX die ACh-Expression gleichermaßen modifizieren. Hingegen wurde die AChE-Aktivität vornehmlich durch DEX beeinflusst. Dabei zeigte DEX je nach Gewebe einen unterschiedlichen Einfluss auf die AChE-Aktivität. In der Milz und im Hippocampus erhöhte DEX die AChE-Aktivität, im Cortex jedoch reduzierte DEX die AChE-Aktivität. Der AChE-aktivierende Effekt von DEX war besonders in der Milz nach 24 Stunden deutlich zu beobachten. Dies spiegelte sich auch in der Korrelationsanalyse zwischen AChE und ACh wider, da nach 24 Stunden

keine Korrelation zwischen der AChE-Aktivität und der ACh-Expression festgestellt wurde und damit Hinweise darauf gibt, dass die erhöhte AChE-Aktivität vermutlich nicht mit einer reduzierten ACh-Expression einherging. Diese Beobachtung steht im vermeintlichen Widerspruch zu den Ergebnissen der Autophagie- und Apoptose-Ebene, da ein Anstieg des ACh-spaltenden Enzyms AChE oft als schädlich interpretiert wird [91]. Dem entgegenzuhalten ist aber, dass dieses Enzym abgesehen von der ACh-Hydrolyse, auch andere Funktionen außerhalb des cholinergen Systems besitzt [93]. So spielt AChE eine wichtige Rolle bei der Bildung von Neuriten, der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte und innerhalb der Hämatopoese, wo es das Wachstum von Erythrozyten und Thrombozyten reguliert [93]. Klinische Studien haben zudem gezeigt, dass niedrige Cholinesterase-Spiegel im Serum von Brandopfern vorliegen, welche zum Teil mit einer erhöhten Mortalität einhergehen [94] und dass präoperativ niedrige Cholinesterase-Spiegel mit einem erhöhten POD-Risiko assoziiert sind [95]. In Anbetracht der Apoptose-abschwächenden und Autophagie-unterstützenden Wirkung von DEX könnten diese Ergebnisse einen Anhaltspunkt dafür geben, dass die erhöhte AChE-Aktivität in der Milz eventuell einen protektiven Effekt hatte.

2.4.4 Limitationen

Obwohl die hier untersuchten miRNAs in der Literatur vielfach als Autophagie-modifizierend beschrieben wurden, konnte in dieser Arbeit kein direkter Zusammenhang zwischen den untersuchten miRNAs und der Autophagie gefunden werden. Allerdings sind die posttranslationalen Modifikationen durch miRNAs ein sehr komplexer Prozess. Eine spezifische miRNA kann bis zu 100 verschiedene Ziel-mRNAs haben und umgekehrt [96]. Zudem sollte der Einfluss von miRNAs auch eher als eine Form der Feinregulierung der Proteinexpression betrachtet werden [97], dessen Einfluss auf die Proteinexpression abhängig vom Level der miRNA und Ziel-mRNA in einem bestimmten Gewebe ist [98] und sollte daher nicht als reiner Schalter der Genexpression interpretiert werden.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit der Effekt von DEX auf den gesamten Cortex und Hippocampus sowie die gesamte Milz anstatt auf bestimmte (Immun)-zelltypen untersucht, weshalb es schwierig ist, Aussagen über den Effekt von DEX auf die einzelnen Zelltypen zu treffen. Da die Effekte von DEX auf Autophagie, Apoptose und cholinergem anti-inflammatorischen Reflex am stärksten in der Milz beobachtet wurden,

sind weitere Studien nötig, um genauer zu untersuchen, welche Art von (Immun)-zellen durch DEX modifiziert werden können. Zudem aktivierte DEX in der Milz das Enzym AChE und dies wurde von anti-apoptotischen und Autophagie-induzierenden Effekten begleitet. Daher sind weitere Studien auch nötig, um zu untersuchen, wie und wo DEX das Enzym AChE beeinflusst und welche Rolle dieses Enzym auch außerhalb des cholinergen Systems spielt. Hinweise bezüglich der Verteilung von AChE innerhalb der Milz geben die Ergebnisse von Hoover und Kollegen, welche gezeigt haben, dass AChE während einer Sepsis hauptsächlich in Zellen der roten Pulpa gefunden wurde und somit nicht auf Leukozyten, sondern auf myeloiden Zellen lokalisiert ist [91].

Zusätzlich sollten zukünftige Studien auch weitere Untersuchungszeitpunkte enthalten, um eventuelle Veränderungen besser detektieren zu können. Hier sind zum einen frühere Zeitpunkte interessant, um die bereits sehr früh eintretenden Effekte von LPS und DEX auf das Immunsystem zu beobachten [59, 99], aber zum anderen auch noch spätere Zeitpunkte wertvoll, um den Einfluss von DEX auf die miRNA-Expression, die in dieser Arbeit bis zu 7 Tage nach der DEX-Gabe zu messen war, noch weiter zu beobachten. Zudem zeigten andere Studien, dass Expressionsänderungen des $\alpha 7nACh$ -Rezeptors in der Milz nach 8 Stunden [91] und im Gehirn nach 3 Tagen gemessen wurden [92], was bedeuten könnte, dass in dieser Studie eine eventuelle Expressionsänderung des $\alpha 7nAChR$ nicht zum richtigen Zeitpunkt detektiert wurde.

2.4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit haben gezeigt, dass der $\alpha 2$ -AR-Agonist DEX in der Milz Störungen im autophagischen Fluss beheben sowie den Anstieg des Apoptose-Markers cleaved PARP abschwächen kann. Hinsichtlich der zuvor beschriebenen anti-inflammatorischen Wirkung von DEX, weisen diese Ergebnisse auf die Autophagie als einen möglichen zugrundeliegenden Mechanismus hin. In Anbetracht der zentralen Rolle der Milz innerhalb des Immunsystems und der essenziellen Funktion der Autophagie innerhalb der Immunzellen, bietet die Reparatur der Autophagie in diesem Organ einen vielversprechenden Ansatz, um Entzündungen zu bekämpfen. Die primäre Funktion der Autophagie innerhalb des Immunsystems ist es, eine ausgewogene Immunantwort zu vermitteln, die einen maximalen Schutz vor der Infektion bietet und gleichzeitig einen minimalen Schaden für den Wirtsorganismus bedeutet [100]. So zeigten andere Arbeiten beispielsweise, dass ein therapeutischer Anstieg der Autophagie zu einem verbesserten

Überleben von Sepsis-erkrankten Mäusen führt, indem es die Produktion löslicher Inflammationsmediatoren inhibiert [100]. Die Autophagie-induzierende Wirkung von DEX stellt daher einen interessanten, neuen therapeutischen Ansatzpunkt dar, der in zukünftigen Studien noch genauer erforscht werden sollte, um zu analysieren, wie dieses Medikament die Autophagie anregt.

Zudem führte DEX zu einer nachhaltigen Modulation verschiedener miRNAs, die mit der Immunantwort und der Autophagie assoziiert sind. Dabei ist vor allem die Wirkung von DEX auf die miRNAs in der Milz und im Hippocampus zu betonen, da DEX in der Milz die Reduktion wichtiger anti-inflammatorischer miRNAs abschwächen bzw. verhindern und im Hippocampus zusätzlich die Erhöhung pro-inflammatorischer miRNAs hemmen konnte. Da der Einfluss von DEX auf die in dieser Arbeit untersuchten miRNAs bis dato kaum erforscht ist und sich die vorhandenen Studien hauptsächlich auf das Nervensystem, aber nicht auf die Milz konzentrierten, sind zukünftig weitere Studien zum Effekt von DEX auf diesen posttranskriptionalen Regulationsmechanismus nötig. Diese Arbeit und vorangegangene Studien geben aber erste Hinweise darauf, dass die anti-inflammatorische Wirkung von DEX vermutlich auch über miRNAs vermittelt wird.

Zusätzlich zeigte die Arbeit, dass DEX auch auf Moleküle des cholinergen Systems in der Milz und im Gehirn einwirkte, wobei hier besonders die aktivierende Wirkung von DEX auf das Enzym AChE in der Milz auffällig war. Obwohl ein Anstieg dieses Enzyms durch die ACh-hydrolysierende Funktion eher negativ assoziiert ist, geben die Ergebnisse dieser Arbeit keinen Hinweis darauf, dass ein DEX-induzierter Anstieg der AChE-Aktivität negative Konsequenzen hatte, da durch DEX zum gleichen Zeitpunkt auch pro-inflammatorische Marker im Gehirn reduziert [44] und in der Milz der autophagische Fluss repariert sowie die PARP-Spaltung abgeschwächt wurde. In Zukunft sollte daher die genaue Funktion und Lokalisation einer erhöhten AChE-Aktivität in der Milz untersucht werden, um so den Einfluss von DEX auf dieses Enzym besser bewerten zu können.

Zusammenfassend verdeutlicht diese Arbeit, dass DEX die protektive Wirkung über verschiedene Signalwege und Regulationsmechanismen vermittelt. Durch die vorliegende Arbeit konnten neue potenzielle Wirkmechanismen von DEX identifiziert, sowie neue Ansatzpunkte für zukünftige Forschungsvorhaben zu den DEX-induzierten Schutzmechanismen geschaffen werden.

2.5 Literaturverzeichnis

1. Kho W, von Haefen C, Paeschke N, Nasser F, Endesfelder S, Sifringer M, Gonzalez-Lopez A, Lanzke N, Spies CD. Dexmedetomidine Restores Autophagic Flux, Modulates Associated microRNAs and the Cholinergic Anti-inflammatory Pathway upon LPS-Treatment in Rats. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2021.
2. Terrando N, Eriksson LI, Ryu JK, Yang T, Monaco C, Feldmann M, Jonsson Fagerlund M, Charo IF, Akassoglou K, Maze M. Resolving postoperative neuroinflammation and cognitive decline. *Ann Neurol*. 2011;70(6):986-995.
3. Ntalouka MP, Arnaoutoglou E, Tzimas P. Postoperative cognitive disorders: an update. *Hippokratia*. 2018;22(4):147-154.
4. Cascella M, Muzio MR, Bimonte S, Cuomo A, Jakobsson JG. Postoperative delirium and postoperative cognitive dysfunction: updates in pathophysiology, potential translational approaches to clinical practice and further research perspectives. *Minerva Anesthesiol*. 2018;84(2):246-260.
5. Maldonado JR. Delirium pathophysiology: An updated hypothesis of the etiology of acute brain failure. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2018;33(11):1428-1457.
6. Chuan A, Sanders RD. The use of dexmedetomidine to prevent delirium after major cardiac and non-cardiac surgery. *Anaesthesia*. 2021.
7. Barrientos RM, Higgins EA, Biedenkapp JC, Sprunger DB, Wright-Hardesty KJ, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Peripheral infection and aging interact to impair hippocampal memory consolidation. *Neurobiol Aging*. 2006;27(5):723-732.
8. Yamanaka D, Kawano T, Nishigaki A, Aoyama B, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, Locatelli FM, Yokoyama M. Preventive effects of dexmedetomidine on the development of cognitive dysfunction following systemic inflammation in aged rats. *J Anesth*. 2017;31(1):25-35.
9. Yeh CH, Hsieh LP, Lin MC, Wei TS, Lin HC, Chang CC, Hsing CH. Dexmedetomidine reduces lipopolysaccharide induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191070.
10. Ning Q, Liu Z, Wang X, Zhang R, Zhang J, Yang M, Sun H, Han F, Zhao W, Zhang X. Neurodegenerative changes and neuroapoptosis induced by systemic lipopolysaccharide administration are reversed by dexmedetomidine treatment in mice. *Neurol Res*. 2017;39(4):357-366.
11. Zhang X, Jiang X, Huang L, Tian W, Chen X, Gu X, Yu W, Tian J, Su D. Central cholinergic system mediates working memory deficit induced by anesthesia/surgery in adult mice. *Brain Behav*. 2018;8(5):e00957.
12. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-741.

13. Perez-Hernandez M, Arias A, Martinez-Garcia D, Perez-Tomas R, Quesada R, Soto-Cerrato V. Targeting Autophagy for Cancer Treatment and Tumor Chemosensitization. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10).
14. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(6):349-364.
15. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:107-132.
16. Menzies FM, Fleming A, Rubinsztein DC. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(6):345-357.
17. Saha S, Panigrahi DP, Patil S, Bhutia SK. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*. 2018;104:485-495.
18. Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*. 2013;19(8):983-997.
19. Plaza-Zabala A, Sierra-Torre V, Sierra A. Autophagy and Microglia: Novel Partners in Neurodegeneration and Aging. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3).
20. Harris J. Autophagy and cytokines. *Cytokine*. 2011;56(2):140-144.
21. Kuballa P, Nolte WM, Castoreno AB, Xavier RJ. Autophagy and the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:611-646.
22. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(10):722-737.
23. Puleston DJ, Simon AK. Autophagy in the immune system. *Immunology*. 2014;141(1):1-8.
24. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):741-752.
25. McArthur K, Kile BT. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):475-493.
26. Feng Y, Yao Z, Klionsky DJ. How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends Cell Biol*. 2015;25(6):354-363.
27. Stachurska A, Zorro MM, van der Sijde MR, Withoff S. Small and Long Regulatory RNAs in the Immune System and Immune Diseases. *Front Immunol*. 2014;5:513.
28. Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J Biol Chem*. 2017;8(1):45-56.
29. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kundendorf U, Krautwald S, Dong Z. Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(12):2689-2701.

30. Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med*. 2003;9(5-8):125-134.
31. Pavlov VA, Chavan SS, Tracey KJ. *Molecular and Functional Neuroscience in Immunity*. *Annu Rev Immunol*. 2018;36:783-812.
32. Hung SY, Huang WP, Liou HC, Fu WM. Autophagy protects neuron from Abeta-induced cytotoxicity. *Autophagy*. 2009;5(4):502-510.
33. Shao BZ, Ke P, Xu ZQ, Wei W, Cheng MH, Han BZ, Chen XW, Su DF, Liu C. Autophagy Plays an Important Role in Anti-inflammatory Mechanisms Stimulated by Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Front Immunol*. 2017;8:553.
34. Andersson U, Tracey KJ. Neural reflexes in inflammation and immunity. *J Exp Med*. 2012;209(6):1057-1068.
35. Mantz J, Josserand J, Hamada S. Dexmedetomidine: new insights. *Eur J Anaesthesiol*. 2011;28(1):3-6.
36. Jakob SM, Ruokonen E, Grounds RM, Sarapohja T, Garratt C, Pocock SJ, Bratty JR, Takala J. Dexmedetomidine for Long-Term Sedation I. Dexmedetomidine vs midazolam or propofol for sedation during prolonged mechanical ventilation: two randomized controlled trials. *JAMA*. 2012;307(11):1151-1160.
37. Turunen H, Jakob SM, Ruokonen E, Kaukonen KM, Sarapohja T, Apajasalo M, Takala J. Dexmedetomidine versus standard care sedation with propofol or midazolam in intensive care: an economic evaluation. *Crit Care*. 2015;19:67.
38. van Norden J, Spies CD, Borchers F, Mertens M, Kurth J, Heidgen J, Pohrt A, Mueller A. The effect of peri-operative dexmedetomidine on the incidence of postoperative delirium in cardiac and non-cardiac surgical patients: a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Anaesthesia*. 2021.
39. Jin Z, Hu J, Ma D. Postoperative delirium: perioperative assessment, risk reduction, and management. *Br J Anaesth*. 2020.
40. Xiang H, Hu B, Li Z, Li J. Dexmedetomidine controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Inflammation*. 2014;37(5):1763-1770.
41. Ma J, Chen Q, Li J, Zhao H, Mi E, Chen Y, Yi B, Ning J, Ma D, Lu K, Gu J. Dexmedetomidine-Mediated Prevention of Renal Ischemia-Reperfusion Injury Depends in Part on Cholinergic Anti-Inflammatory Mechanisms. *Anesth Analg*. 2020;130(4):1054-1062.
42. Peng M, Wang YL, Wang CY, Chen C. Dexmedetomidine attenuates lipopolysaccharide-induced proinflammatory response in primary microglia. *J Surg Res*. 2013;179(1):e219-225.
43. Ding D, Xu S, Zhang H, Zhao W, Zhang X, Jiang Y, Wang P, Dai Z, Zhang J. 3-Methyladenine and dexmedetomidine reverse lipopolysaccharide-induced acute lung

injury through the inhibition of inflammation and autophagy. *Exp Ther Med*. 2018;15(4):3516-3522.

44. Paeschke N, von Haefen C, Endesfelder S, Sifringer M, Spies CD. Dexmedetomidine Prevents Lipopolysaccharide-Induced MicroRNA Expression in the Adult Rat Brain. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9).
45. Busk PK. A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:29.
46. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-159.
47. Balcells I, Cirera S, Busk PK. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol*. 2011;11:70.
48. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-1108.
49. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010;140(3):313-326.
50. Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal*. 2010;8:31.
51. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):65-80.
52. Ding M, Chen Y, Luan H, Zhang X, Zhao Z, Wu Y. Dexmedetomidine reduces inflammation in traumatic brain injury by regulating the inflammatory responses of macrophages and splenocytes. *Exp Ther Med*. 2019;18(3):2323-2331.
53. Zhu YJ, Peng K, Meng XW, Ji FH. Attenuation of neuroinflammation by dexmedetomidine is associated with activation of a cholinergic anti-inflammatory pathway in a rat tibial fracture model. *Brain Res*. 2016;1644:1-8.
54. Kalb A, von Haefen C, Sifringer M, Tegethoff A, Paeschke N, Kostova M, Feldheiser A, Spies CD. Acetylcholinesterase inhibitors reduce neuroinflammation and -degeneration in the cortex and hippocampus of a surgery stress rat model. *PLoS One*. 2013;8(5):e62679.
55. Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, Kuijlaars J, Langlois X, Matthews LJ, Ver Donck L, Hellings N, Nuydens R. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:271359.
56. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007;55(5):453-462.

57. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol*. 2019;4(33).
58. Jones SA, Mills KH, Harris J. Autophagy and inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol*. 2013;91(3):250-258.
59. Liu Z, Wang Y, Ning Q, Gong C, Zhang Y, Zhang L, Bu X, Jing G. The role of spleen in the treatment of experimental lipopolysaccharide-induced sepsis with dexmedetomidine. *Springerplus*. 2015;4:800.
60. Zhao Y, Feng X, Li B, Sha J, Wang C, Yang T, Cui H, Fan H. Dexmedetomidine Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury by Enhancing Autophagy Through Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Front Pharmacol*. 2020;11:128.
61. Yu T, Liu D, Gao M, Yang P, Zhang M, Song F, Zhang X, Liu Y. Dexmedetomidine prevents septic myocardial dysfunction in rats via activation of α_7 nAChR and PI3K/Akt-mediated autophagy. *Biomed Pharmacother*. 2019;120:109231.
62. Luan YY, Yao YM, Xiao XZ, Sheng ZY. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. *J Interferon Cytokine Res*. 2015;35(1):17-22.
63. Qiao H, Sanders RD, Ma D, Wu X, Maze M. Sedation improves early outcome in severely septic Sprague Dawley rats. *Crit Care*. 2009;13(4):R136.
64. Yeh YC, Wu CY, Cheng YJ, Liu CM, Hsiao JK, Chan WS, Wu ZG, Yu LC, Sun WZ. Effects of Dexmedetomidine on Intestinal Microcirculation and Intestinal Epithelial Barrier in Endotoxemic Rats. *Anesthesiology*. 2016;125(2):355-367.
65. Feng P, Zhang A, Su M, Cai H, Wang X, Zhang Y. Dexmedetomidine inhibits apoptosis of astrocytes induced by oxygen-glucose deprivation via targeting JAK/STAT3 signal pathway. *Brain Res*. 2021;1750:147141.
66. Gaudet AD, Fonken LK, Watkins LR, Nelson RJ, Popovich PG. MicroRNAs: Roles in Regulating Neuroinflammation. *Neuroscientist*. 2018;24(3):221-245.
67. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget*. 2015;6(11):8474-8490.
68. Gu Y, Fei Z, Zhu R. miR-21 modulates cisplatin resistance of gastric cancer cells by inhibiting autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Anticancer Drugs*. 2020;31(4):385-393.
69. Sun L, Zhao M, Wang Y, Liu A, Lv M, Li Y, Yang X, Wu Z. Neuroprotective effects of miR-27a against traumatic brain injury via suppressing FoxO3a-mediated neuronal autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;482(4):1141-1147.
70. Zhang J, Qiu W, Ma J, Wang Y, Hu Z, Long K, Wang X, Jin L, Tang Q, Tang G, Zhu L, Li X, Shuai S, Li M. miR-27a-5p Attenuates Hypoxia-induced Rat Cardiomyocyte Injury by Inhibiting Atg7. *Int J Mol Sci*. 2019;20(10).

71. Kim J, Fiesel FC, Belmonte KC, Hudec R, Wang WX, Kim C, Nelson PT, Springer W, Kim J. miR-27a and miR-27b regulate autophagic clearance of damaged mitochondria by targeting PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1). *Mol Neurodegener.* 2016;11(1):55.
72. Yang J, Chen D, He Y, Melendez A, Feng Z, Hong Q, Bai X, Li Q, Cai G, Wang J, Chen X. MiR-34 modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan via repressing the autophagy gene *atg9*. *Age (Dordr).* 2013;35(1):11-22.
73. Morgado AL, Xavier JM, Dionisio PA, Ribeiro MF, Dias RB, Sebastiao AM, Sola S, Rodrigues CM. MicroRNA-34a Modulates Neural Stem Cell Differentiation by Regulating Expression of Synaptic and Autophagic Proteins. *Mol Neurobiol.* 2015;51(3):1168-1183.
74. Wang P, Liang J, Li Y, Li J, Yang X, Zhang X, Han S, Li S, Li J. Down-regulation of miRNA-30a alleviates cerebral ischemic injury through enhancing beclin 1-mediated autophagy. *Neurochem Res.* 2014;39(7):1279-1291.
75. Yu Y, Yang L, Zhao M, Zhu S, Kang R, Vernon P, Tang D, Cao L. Targeting microRNA-30a-mediated autophagy enhances imatinib activity against human chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia.* 2012;26(8):1752-1760.
76. Xiao J, Zhu X, He B, Zhang Y, Kang B, Wang Z, Ni X. MiR-204 regulates cardiomyocyte autophagy induced by ischemia-reperfusion through LC3-II. *J Biomed Sci.* 2011;18:35.
77. Yan L, Shi E, Jiang X, Shi J, Gao S, Liu H. Inhibition of MicroRNA-204 Conducts Neuroprotection Against Spinal Cord Ischemia. *Ann Thorac Surg.* 2019;107(1):76-83.
78. Song J, Oh Y, Lee JE. miR-Let7A Modulates Autophagy Induction in LPS-Activated Microglia. *Exp Neurobiol.* 2015;24(2):117-125.
79. Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol.* 2015;6:19.
80. Jian YP, Dong SJ, Xu SS, Fan J, Liu WJ, Shao XW, Li T, Zhao SH, Wang YG. MicroRNA-34a suppresses neuronal apoptosis and alleviates microglia inflammation by negatively targeting the Notch pathway in spinal cord injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(3):1420-1427.
81. Lv YN, Ou-Yang AJ, Fu LS. MicroRNA-27a Negatively Modulates the Inflammatory Response in Lipopolysaccharide-Stimulated Microglia by Targeting TLR4 and IRAK4. *Cell Mol Neurobiol.* 2017;37(2):195-210.
82. Fang X, Sun D, Wang Z, Yu Z, Liu W, Pu Y, Wang D, Huang A, Liu M, Xiang Z, He C, Cao L. MiR-30a Positively Regulates the Inflammatory Response of Microglia in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Neurosci Bull.* 2017;33(6):603-615.
83. Nguyen V, Tiemann D, Park E, Salehi A. Alpha-2 Agonists. *Anesthesiol Clin.* 2017;35(2):233-245.

84. Silva AM, Almeida MI, Teixeira JH, Ivan C, Oliveira J, Vasconcelos D, Neves N, Ribeiro-Machado C, Cunha C, Barbosa MA, Calin GA, Santos SG. Profiling the circulating miRnome reveals a temporal regulation of the bone injury response. *Theranostics*. 2018;8(14):3902-3917.
85. Li H, Lu C, Yao W, Xu L, Zhou J, Zheng B. Dexmedetomidine inhibits inflammatory response and autophagy through the circLrp1b/miR-27a-3p/Dram2 pathway in a rat model of traumatic brain injury. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(21):21687-21705.
86. Ha Sen Ta N, Nuo M, Meng QT, Xia ZY. The Pathway of Let-7a-1/2-3p and HMGB1 Mediated Dexmedetomidine Inhibiting Microglia Activation in Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury Mice. *J Mol Neurosci*. 2019;69(1):106-114.
87. Xing N, Xing F, Li Y, Li P, Zhang J, Wang D, Zhang W, Yang J. Dexmedetomidine improves propofol-induced neuronal injury in rat hippocampus with the involvement of miR-34a and the PI3K/Akt signaling pathway. *Life Sci*. 2020;247:117359.
88. Liang M, Shao A, Tang X, Feng M, Wang J, Qiu Y. MiR-34a affects dexmedetomidine-inhibited chronic inflammatory visceral pain by targeting to HDAC2. *BMC Anesthesiol*. 2019;19(1):131.
89. Zi SF, Li JH, Liu L, Deng C, Ao X, Chen DD, Wu SZ. Dexmedetomidine-mediated protection against septic liver injury depends on TLR4/MyD88/NF-kappaB signaling downregulation partly via cholinergic anti-inflammatory mechanisms. *Int Immunopharmacol*. 2019;76:105898.
90. Rong H, Zhao Z, Feng J, Lei Y, Wu H, Sun R, Zhang Z, Hou B, Zhang W, Sun Y, Gu X, Ma Z, Liu Y. The effects of dexmedetomidine pretreatment on the pro- and anti-inflammation systems after spinal cord injury in rats. *Brain Behav Immun*. 2017;64:195-207.
91. Hoover DB, Poston MD, Brown S, Lawson SE, Bond CE, Downs AM, Williams DL, Ozment TR. Cholinergic leukocytes in sepsis and at the neuroimmune junction in the spleen. *Int Immunopharmacol*. 2020;81:106359.
92. Lykhmus O, Mishra N, Koval L, Kalashnyk O, Gergalova G, Uspenska K, Komisarenko S, Soreq H, Skok M. Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain. *Front Mol Neurosci*. 2016;9:19.
93. Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(4):294-302.
94. Kamolz LP, Andel H, Greher M, Ploner M, Meissl G, Frey M. Serum cholinesterase activity reflects morbidity in burned patients. *Burns*. 2002;28(2):147-150.
95. Cerejeira J, Batista P, Nogueira V, Firmino H, Vaz-Serra A, Mukaetova-Ladinska EB. Low preoperative plasma cholinesterase activity as a risk marker of postoperative delirium in elderly patients. *Age Ageing*. 2011;40(5):621-626.

96. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(4):1202-1207.
97. Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA*. 2008;14(1):35-42.
98. Mukherji S, Ebert MS, Zheng GX, Tsang JS, Sharp PA, van Oudenaarden A. MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nat Genet*. 2011;43(9):854-859.
99. Taniguchi T, Kurita A, Kobayashi K, Yamamoto K, Inaba H. Dose- and time-related effects of dexmedetomidine on mortality and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats. *J Anesth*. 2008;22(3):221-228.
100. Cadwell K. Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(11):661-675.

3 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Widuri Miriam Kho, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Rolle der Autophagie in Dexmedetomidin-induzierter Neuroprotektion / The Role of Autophagy in Dexmedetomidine-induced Neuroprotection selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

4 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Widuri Miriam Kho hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Widuri Kho, Clarissa von Haefen, Nadine Paeschke, Fatme Nasser, Stefanie Endesfelder, Marco Sifringer, Adrián González-López, Nadine Lanzke, Claudia D Spies. Dexmedetomidine Restores Autophagic Flux, Modulates Associated microRNAs and the Cholinergic Anti-inflammatory Pathway upon LPS-Treatment in Rats. J Neuroimmune Pharmacology 2021 Aug 6. doi: 10.1007/s11481-021-10003-w

Beitrag im Einzelnen:

Die Doktorandin, Widuri Miriam Kho, führte eigenständig die Protein-Isolierung aus Cortex und Hippocampus, die Antikörper-Optimierung sowie Proteinanalysen mittels Western Blot in diesen Hirnregionen durch. In Zusammenarbeit mit Fatme Nasser führte die Doktorandin außerdem die Protein-Isolation und die Western Blot-Analysen in der Milz durch. Aus diesen Analysen sind die Ergebnisse für die Abbildungen 1, 2, 3 und 8 a-c der oben genannten Publikation entstanden.

Die Doktorandin führte eigenständig die Literaturrecherche hinsichtlich geeigneter microRNAs sowie die Isolierung der Gesamt-RNA aus Milz, Cortex und Hippocampus, sowie das Design und die Optimierung der miRNA-Primer für die Real-Time-PCR durch. Zudem analysierte die Doktorandin eigenständig die miRNA-Expression mittels Real-Time-PCR im Cortex und Hippocampus sowie in Zusammenarbeit mit Jasmin Jende in der Milz. Aus diesen Analysen sind die Ergebnisse für die Abbildungen 4, 5, 6 und 7 der oben genannten Publikation entstanden.

Die Doktorandin führte eigenständig die Analysen der ACh-/AChE-Aktivitätsassays mittels Fluoreszenzspektroskopie in der Milz, dem Cortex und Hippocampus durch. Aus diesen Analysen sind die Ergebnisse für die Abbildungen 8 d-i der oben genannten Publikation entstanden.

Die Daten aller genannten Analysen wurden von der Doktorandin eigenständig statistisch ausgewertet sowie graphisch dargestellt.

Ein Entwurf des Manuskripts wurde eigenständig von der Doktorandin mithilfe einer Literaturrecherche entworfen und in Abstimmung mit den Ko-Autor:innen fertiggestellt, das graphische Abstract (Abbildung 16) wurde von der Doktorandin selbstständig entworfen und in Abstimmung mit Amelie Stute fertiggestellt sowie der Peer-Review-Prozess in Abstimmung mit der korrespondierenden Autorin selbstständig durchgeführt.

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

5 Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"PHARMACOLOGY and PHARMACY"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 270 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY	33,154	64.797	0.049170
2	PHARMACOLOGICAL REVIEWS	12,500	17.395	0.010370
3	TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES	13,034	13.503	0.017780
4	ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS	36,796	13.300	0.033170
5	Annual Review of Pharmacology and Toxicology	7,812	11.250	0.007970
6	DRUG RESISTANCE UPDATES	3,165	11.000	0.004220
7	PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	16,615	10.557	0.023490
8	MEDICINAL RESEARCH REVIEWS	4,974	9.300	0.005360
9	BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY	34,040	7.730	0.031300
10	JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE	49,132	7.727	0.051270
11	ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	21,233	7.515	0.032840
12	DRUG DISCOVERY TODAY	15,022	7.321	0.020720
13	Acta Pharmaceutica Sinica B	3,560	7.097	0.006580
14	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	26,281	6.751	0.040680
15	European Heart Journal-Cardiovascular Pharmacotherapy	521	6.696	0.001640
16	CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS	16,749	6.565	0.018290
17	DRUGS	11,128	6.189	0.014190
18	Neurotherapeutics	4,998	6.035	0.009520
19	PHARMACOLOGICAL RESEARCH	13,517	5.893	0.019090
20	EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS	3,350	5.611	0.005090

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS	5,169	5.473	0.007470
22	JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY	32,470	5.439	0.048840
23	BIODRUGS	1,803	5.313	0.002980
24	International Journal of Nanomedicine	23,279	5.115	0.028200
25	EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS	4,833	5.081	0.006230
26	ACTA PHARMACOLOGICA SINICA	9,668	5.064	0.009310
27	BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY	27,929	4.960	0.020770
28	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY	67,707	4.904	0.082760
29	DRUG DELIVERY	5,590	4.902	0.008420
30	Expert Opinion on Drug Discovery	3,427	4.887	0.006290
31	INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS	48,995	4.845	0.034660
32	Expert Opinion on Drug Delivery	6,690	4.838	0.007220
33	CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY	6,720	4.807	0.009270
34	CNS DRUGS	4,768	4.786	0.007670
35	JOURNAL OF FOOD AND DRUG ANALYSIS	3,897	4.727	0.005550
36	Biomedicines	1,156	4.717	0.002850
37	Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology	805	4.700	0.000670
38	Current Neuropharmacology	4,178	4.668	0.006280
39	INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS	12,403	4.621	0.017890
40	CLINICAL PHARMACOKINETICS	8,919	4.604	0.008920
40	EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS	16,822	4.604	0.014330
42	BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY	25,449	4.545	0.041300

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
43	NEUROPHARMACOLOGY	21,682	4.431	0.033110
44	Pharmaceutics	3,227	4.421	0.004080
45	PROGRESS IN NEURO- PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY	11,179	4.361	0.013670
46	PHARMACOPSYCHIATRY	1,787	4.340	0.001580
47	INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	6,749	4.333	0.011150
48	MOLECULAR PHARMACEUTICS	18,599	4.321	0.026080
49	Pharmaceuticals	3,357	4.286	0.004710
50	PHYTOMEDICINE	11,272	4.268	0.008460
51	Therapeutic Advances in Chronic Disease	721	4.257	0.001700
52	Frontiers in Pharmacology	18,650	4.225	0.042330
53	CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY	17,243	4.184	0.012960
54	VASCULAR PHARMACOLOGY	3,141	4.152	0.004980
55	Journal of Neuroimmune Pharmacology	2,809	4.113	0.003520
56	ANTIVIRAL RESEARCH	8,708	4.101	0.014670
57	TOXICOLOGY	13,677	4.099	0.007760
58	PHYTOTHERAPY RESEARCH	14,260	4.087	0.008800
59	CNS Neuroscience & Therapeutics	3,598	4.074	0.005870
60	CARDIOVASCULAR DRUGS AND THERAPY	2,114	4.069	0.003340
61	Asian Journal of Pharmaceutical Sciences	1,965	3.968	0.003080
62	DRUG METABOLISM REVIEWS	2,616	3.956	0.002040
63	INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY	14,297	3.943	0.017810
64	Antibiotics-Basel	1,357	3.893	0.003490

6 Druckexemplar der Publikation

Kho W, von Haefen C, Paeschke N, Nasser F, Endesfelder S, Sifringer M, et al. Dexmedetomidine Restores Autophagic Flux, Modulates Associated microRNAs and the Cholinergic Anti-inflammatory Pathway upon LPS-Treatment in Rats. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2021.

Journal Impact Factor (2019): 4,113
(Rank 55/270 in Pharmacology and Pharmacy)



Dexmedetomidine Restores Autophagic Flux, Modulates Associated microRNAs and the Cholinergic Anti-inflammatory Pathway upon LPS-Treatment in Rats

Widuri Kho¹ · Clarissa von Haefen¹ · Nadine Paeschke¹ · Fatme Nasser¹ · Stefanie Endesfelder² · Marco Sifringer¹ · Adrián González-López^{1,3} · Nadine Lanzke¹ · Claudia D. Spies¹

Received: 2 March 2021 / Accepted: 26 June 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Infections and perioperative stress can lead to neuroinflammation, which in turn is linked to cognitive impairments such as postoperative delirium or postoperative cognitive dysfunctions. The α_2 -adrenoceptor agonist dexmedetomidine (DEX) prevents cognitive impairments and has organo-protective and anti-inflammatory properties. Macroautophagy (autophagy) regulates many biological processes, but its role in DEX-mediated anti-inflammation and the underlying mechanism of DEX remains largely unclear. We were interested how a pretreatment with DEX protects against lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in adult male Wistar rats. We used Western blot and activity assays to study how DEX modulated autophagy- and apoptosis-associated proteins as well as molecules of the cholinergic anti-inflammatory pathway, and qPCR to analyse the expression of autophagy and inflammation-associated microRNAs (miRNA) in the spleen, cortex and hippocampus at different time points (6 h, 24 h, 7 d). We showed that a DEX pretreatment prevents LPS-induced impairments in autophagic flux and attenuates the LPS-induced increase in the apoptosis-associated protein cleaved poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP) in the spleen. Both, DEX and LPS altered miRNA expression and molecules of the cholinergic anti-inflammatory pathway in the spleen and brain. While only a certain set of miRNAs was up- and/or downregulated by LPS in each tissue, which was prevented or attenuated by a DEX pretreatment in the spleen and hippocampus, all miRNAs were up- and/or downregulated by DEX itself – independent of whether or not they were altered by LPS. Our results indicate that the organo-protective effect of DEX may be mediated by autophagy, possibly by acting on associated miRNAs, and the cholinergic anti-inflammatory pathway.

Keywords Dexmedetomidine · Brain · Spleen · Autophagy · microRNA · Cholinergic anti-inflammatory pathway

Introduction

Cognitive impairments, such as postoperative delirium (POD) or postoperative cognitive dysfunctions (POCD) are common consequences of surgery/anesthesia and are

linked to perioperative stress-induced neuroinflammation (Ntalouka et al. 2018). The elderly population is particularly affected by these pathologies, showing a prevalence of up to 53% (Saxena and Maze 2018). Due to the increase in life expectancy and surgery rates, POD/POCD are becoming a significant burden for the public health system (Ntalouka et al. 2018). Thus, controlling the immune response is a crucial step to limit neuroinflammation and thereby the risk for developing cognitive dysfunctions.

Dexmedetomidine (DEX), a α_2 -adrenoceptor (α_2 -AR) agonist, is a promising candidate to prevent cognitive impairments, as has been shown in experimental (Endesfelder et al. 2017; Paeschke et al. 2017) and clinical studies (Jakob et al. 2012; Turunen et al. 2015). In experimental studies, DEX was able to reduce the inflammatory response within the brain (Endesfelder et al.

✉ Clarissa von Haefen
clarissa.von-haefen@charite.de

¹ Department of Anesthesiology and Operative Intensive Care Medicine, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

² Department of Neonatology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

³ CIBER-Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

2017; Paeschke et al. 2017) and other organs (Qiao et al. 2009; Zhao et al. 2020), but the underlying mechanism is still not fully understood. Recent studies indicate that the anti-inflammatory properties of DEX might be mediated via autophagy and the cholinergic anti-inflammatory pathway (Qiao et al. 2009; Zhao et al. 2020).

Autophagy, the internal waste reduction and recycling system of cells, is an essential cellular process for maintaining cell homeostasis and adaption to physiological stress. It is particularly important for neuron survival and the regulation of immune response (Deretic et al. 2013; Nixon 2013; Puleston and Simon 2014). Neurons, as postmitotic cells, rely heavily on autophagy to dilute the accumulated cellular waste otherwise controlled by cell division (Nixon 2013), while in the immune system, autophagy controls inflammation in a number of different ways. It balances the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages, dendritic cells and microglia (Harris 2011; Plaza-Zabala et al. 2017), contributes to antigen presentation (Puleston and Simon 2014) and regulates Th17 polarization (Deretic et al. 2013) as well as B- and T-cell development and survival (Kuballa et al. 2012). Disruption of neuronal and glial autophagy are associated with a wide range of neurological diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's or Alzheimer's disease (Nixon 2013; Plaza-Zabala et al. 2017) and due to its central role within the immune system, disruptions of immune cell autophagy also have detrimental outcomes (Deretic et al. 2013).

Autophagy, as a highly dynamic process, undergoes complex regulatory mechanisms, including the modulation by microRNAs (miRNAs) (Feng et al. 2015). These small non-coding single stranded RNAs regulate gene expression on a post-transcriptional level and have been studied in depth regarding their regulatory role in autophagy, apoptosis and immune cell development and function (Stachurska et al. 2014; Su et al. 2016).

Furthermore, the cholinergic anti-inflammatory pathway, a communication route between the central nervous system (CNS) and the immune system, also greatly regulates the immune system by restricting the pro-inflammatory response, and the spleen is greatly involved in this pathway (Pavlov et al. 2003). It has recently been shown that the cholinergic anti-inflammatory pathway is also associated with autophagy (Shao et al. 2017) and might be involved in the DEX mediated effects (Zhu et al. 2016).

Therefore, to understand the working mechanism of DEX during inflammation, we used lipopolysaccharide (LPS) to generate an inflammation model in adult male Wistar rats. We previously showed that both, peripheral surgery combined with LPS as well as an LPS injection alone, trigger a pro-inflammatory immune response and impair autophagy within the rat brain (Kalb et al. 2013; Paeschke et al. 2017; von Haefen et al. 2018). In this study, we have now investigated

the effect of DEX on the immune system, autophagy and associated miRNAs, and the cholinergic anti-inflammatory pathway in the spleen and brain.

Materials and Methods

Animal Model

A total of 94 male Wistar rats (250 – 300 g) aged three months were obtained from Charité-Universitätsmedizin Berlin (Germany) and used in this study. All rats were housed at room temperature (22 ± 2 °C) under a standard 12-12 h light-dark cycle and constant humidity (40 – 70%). Food and water were available *ad libitum*. To induce a systemic inflammation, the rats were injected intraperitoneally (i.p.) with LPS (1 mg/kg body weight) in the presence or absence of a prior i.p. injection of DEX (dexdor®, Orion Pharma, Espoo, Finland; 5 µg/kg body weight) or control vehicle NaCl (0.9%), which was administered 10 min prior to the LPS injection. The animals were randomized into different experimental groups: a) NaCl, b) LPS, c) DEX and d) DEX+LPS. Animals were sacrificed at three different time points: 6 h, 24 h and 7 d. Prior to any injections, animals underwent a short isoflurane-oxygen anesthesia, to minimize the influence of the animals' individual stress responses on the injections and handling. All animal experiments were approved and performed in accordance with the guidelines of the Charité - Universitätsmedizin Berlin, Germany and the national ethic principles (registration no. G 0145/13, 1 July 2013).

Tissue Preparation

Animals were sacrificed under deep isoflurane-oxygen narcosis by transcardial perfusion with PBS (pH 7.4) at the specified time points. Spleens were collected and immediately snap frozen. Brains were harvested and immediately microdissected into the cortical and hippocampal tissue and then snap frozen in liquid nitrogen. Samples were kept at -80 °C for further biochemical analysis.

Immunoblotting

Tissue samples (80 – 100 mg) were homogenized in a standard RIPA buffer (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, #R0278) containing cOmplete™, mini, EDTA-free (Roche, Mannheim, Germany) and PhosSTOP™ (Roche, Mannheim, Germany) using a tissue homogenizer (FastPrep®-24, MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). The homogenates were fractionated by centrifugation at 3,000 g and 4 °C for 10 min, followed by a centrifugation at 17,000 g and 4 °C for 20 min. The remaining cytosolic

Table 1 Primary Antibodies

Antibody	Dilution	Company	Catalogue Number
rabbit anti-Atg5	1:1,000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#12994
rabbit anti-SQSTM1/p62	1:1,000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#5114
rabbit anti-LC3A/B	1:1,000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#4108
rabbit anti-Bcl-2	1:1,000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#2870
rabbit anti-Cytochrome C	1:1,000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#11940
rabbit anti-PARP	1:1,000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#9542
rabbit anti-nicotinic Acetylcholine R alpha 7/ CHRNA7	1:1,000	Novus Biologicals, Abingdon, United Kingdom	NBP1-79948
mouse anti- β -Actin-Peroxidase	1:50,000	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	#A3854
rabbit anti- β -Tubulin	1:1,000	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	#2128

fraction was used for analyses. Protein concentrations were measured by using the bicinchoninic acid (BCA) assay from Thermo SCIENTIFIC (Rockford, IL, USA) following the manufacturer's instructions.

For Western blot analyses 20 μ g of protein from each sample were separated by a 10% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (0.2 μ m pore, Bio-Rad, Munich, Germany). Prior to primary antibody incubation overnight, membranes were blocked with 5% low fat milk solution (Carl ROTH, Karlsruhe, Germany) for 1 h at room temperature. The primary antibodies used in this study are shown in Table 1. All primary antibodies were dissolved in 1x PBST with 1% BSA. For normalization and protein loading control, membranes were incubated with monoclonal mouse anti- β -Actin-Peroxidase or monoclonal rabbit anti- β -Tubulin antibodies at concentrations of 1:50,000 and 1:1,000 in 1x PBST respectively. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA, anti-rabbit, cat. no. 4020-05) were diluted 1:25,000 in 1x PBST. Chemiluminescence signals were detected with Immobilon Forte Western HRP substrate (Merck, Darmstadt, Germany) at a FUSION Solo S Vilber Lourmat detection system (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany), using the Fusion® Software (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany).

Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay

The Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit (Invitrogen®, Karlsruhe, Germany, A1227) was used to measure the ACh expression and AChE activity within the tissues. Again, the cytosolic fractions of the tissue homogenates were used for this assay. In brief, for measurements a standard curve of ACh and AChE respectively was prepared, and the tissue probes were diluted

with 1x reaction buffer appropriately. Afterwards, standard curve probes and diluted tissue probes were pipetted into a black 96-well plate (BRAND® microplate BRANDplates®, Wertheim, Germany, 781668) and a working solution containing 400 μ M Amplex Red reagent, 2 U/mL HRP, 0.2 U/mL choline oxidase and 1 U/mL acetylcholinesterase for ACh analyses or 400 μ M Amplex Red reagent, 2 U/mL HRP, 0.2 U/mL choline oxidase and 100 μ M acetylcholine for AChE analyses were prepared and added to standard curve probes and tissue probes in a 1:1 ratio. All probes were measured twice to avoid measuring errors and a solution containing only 1x reaction buffer was used as negative control. The probes were measured with a fluorescence microplate reader (Tecan Infinite® M200, Zurich, Switzerland) with an excitation at 560 nm and emission detection at 590 nm.

Semiquantitative Real-Time PCR and miRNA expression analysis

The total RNA containing miRNA was isolated from snap frozen cortical, hippocampal and splenic tissue by acidic phenol/chloroform extraction (peqGOLD RNAPure™ System, VWR, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instruction.

For analyses on miRNA level, the method published by Balcells et al. (Balcells et al. 2011) was used, which is based on polyadenylating the miRNA prior to the reverse transcription with a special RT-primer. Therefore, 500 ng total RNA containing miRNA was polyadenylated by using a 0.75 U Poly-A-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) and then reversely transcribed with 1 μ M RT-primer (5'-CAGGTCCAGTTT TTTTTTTTTT-3'), 0.1 mM dNTP mix, 1 mM ATP, 80 U M-MLV reverse transcriptase (Promega, Mannheim, Germany) and 1 μ L of 10x poly(A)polymerase buffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany). Volumes were filled up with water to 10 μ L and incubated for 60 min at 42 °C followed an enzyme inactivation for 5 min at

Table 2 miRNA Primer Sequence

miR-21-5p forward primer	5'-GCAGTAGCTTATCAGACTGATG-3'
reverse primer	5'-GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCAAC-3'
miR-27a-3p forward primer	5'-GCAGTTCACAGTGGCTAAG-3'
reverse primer	5'-CCAGTTTTTTTTTTTTTTTGGCGGA-3'
miR-30a-5p forward primer	5'-GCAGTGTAACATCCTCGAC-3'
reverse primer	5'-TCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCTCCA-3'
miR-34a-5p forward primer	5'-GCAGTGGCAGTGTCTTAG-3'
reverse primer	5'-GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTACAAC-3'
miR-204-5p forward primer	5'-CGCAGTTCCTTTGTGCATC-3'
reverse primer	5'-CCAGTTTTTTTTTTTTTTTAGGCATAG-3'
miR-Let-7a-5p forward primer	5'-GCAGTGAGGTAGTAGGTTG-3'
reverse primer	5'-GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAACTA TAC-3'
snU6RNA forward primer	5'-ATACAGAGAAGATTAGCATGGCC-3'
reverse primer	5'-CGAATTTGCGTGCATCCTTG-3'

90 °C. For miRNAs measurements, primers were designed manually using the software tool by Busk (Busk 2014). Primer sequences are shown in Table 2. 10 ng cDNA from cortical, hippocampal or splenic tissue were used as input for Real-Time PCR with GoTaq qPCR 2x Master Mix (Promega, Mannheim, Germany), the specific miR primers and water. SnU6RNA was used as endogenic control for all miRNAs.

All Real-Time PCR gene expression experiments were analysed using a QuantStudio™ 5 detection system (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) and the QuantStudio™ Design & Analysis Software (v1.4.3 Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen 2001).

Statistical Analyses

All experiments were performed with $n = 6-8$ animals per group. Sample size was calculated on markers of neuroinflammation (Paeschke et al. 2017). All data are shown as boxplots. Differences within the groups of one time point were calculated by using the non-parametric Kruskal-Wallis test and the Dunn's multiple comparisons test as post-hoc analyses. Correlation analyses were conducted with the non-parametric Spearman correlation. A p value of < 0.05 was considered significant. All graphical and statistical analyses were performed with the software GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, CA, USA).

Results

DEX Restores the LPS-Induced Inhibition of Autophagic Flux in the Spleen

As autophagy regulates immune cells (Deretic et al. 2013) and plays a crucial role in the survival of neurons (Nixon 2013), we were interested whether LPS influences the autophagic process in the spleen and brain and whether a pretreatment with DEX is able to repair possible disturbances in these organs.

In the spleen, treatment with LPS increased the expression of autophagy-relevant protein Atg5 significantly after 6 h compared to the NaCl control group. DEX alone (DEX) and DEX in combination with LPS (DEX+LPS) also significantly increased Atg5 expression at this time point (Fig. 1a). After 24 h, the Atg5 expression remained upregulated in the LPS group, whereas the DEX and DEX+LPS group just showed tendencies of such an increase. In contrast, after 7 d, LPS significantly decreased the Atg5 expression, and this was also observed in the DEX+LPS, but not in the DEX group (Fig. 1a).

An intact autophagic flux, which can be detected by the amount of microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC3-II) and sequestosome 1 (SQSTM1)/p62, was disturbed by LPS, but could be restored by a DEX pretreatment (DEX+LPS). LPS did not change LC3-II expression (Fig. 1d), but significantly increased the SQSTM1/p62 expression after 24 h compared to the NaCl control (Fig. 1g). In contrast, DEX+LPS increased the expression of LC3-II significantly compared to control and LPS group (Fig. 1d) but did not alter SQSTM1/p62 expression compared to controls after 24 h (Fig. 1g). Thus, we found that both, LPS and DEX, induced autophagy, but that only a pretreatment with DEX restored the LPS-induced disturbances in the autophagic flux in the spleen.

Contrary to the spleen, we did not detect any changes induced by the peripheral LPS injection, nor any effects of a DEX treatment on autophagy or the autophagic flux in the cortex (Fig. 1b, e, h) and in the hippocampus (Fig. 1c, f, i).

DEX attenuates the LPS-induced PARP cleavage in the spleen

As autophagy and apoptosis are closely connected (Maiuri et al. 2007) and as DEX was previously described to have anti-apoptotic properties (Dardalas et al. 2019), we also examined whether DEX would change apoptosis-associated proteins in the spleen and brain.

In the spleen, LPS significantly increased the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 after 6 h compared to the NaCl control group. A similar change was also observed in the DEX group, whereas a DEX pretreatment

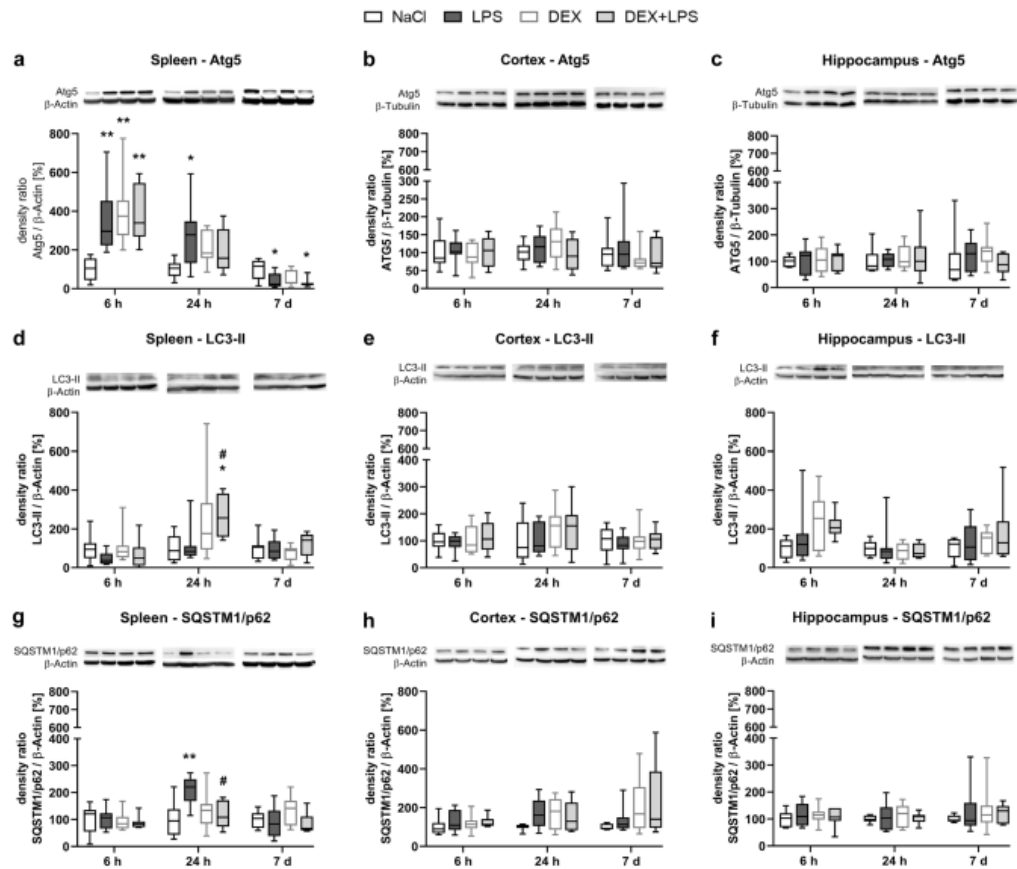


Fig. 1 DEX restores the LPS-induced inhibition of the autophagic flux in the spleen. Changes in autophagy-associated proteins **a-c** Atg5, **d-f** LC3-II and **g-i** SQSTM1/p62 in the spleen, cortex and hippocampus were detected by immunoblotting and analysed by densitometric quantification. Results are shown as boxplots with $n=6-8$

per group and data normalized to levels of NaCl-treated rats (control=100%). **a-i** * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ in Kruskal–Wallis test, followed by a Dunn's multiple comparisons post-hoc test vs NaCl group; and # $p < 0.05$ in Kruskal–Wallis test, followed by a Dunn's multiple comparisons post-hoc test between LPS and DEX+LPS group

(DEX+LPS) just showed tendencies of such an increase (Fig. 2a). While no differences compared to the control group were visible after 24 h anymore, LPS significantly decreased the Bcl-2 expression after 7 d, and this was also observed in the DEX and DEX+LPS group.

We also measured the release of Cytochrome C from mitochondria into the cytosol, but detected no changes in the Cytochrome C protein expression within the three treatment groups compared to control group in the spleen (Fig. 2d).

Despite the increase in Bcl-2 expression, LPS also significantly increased the protein expression of cleaved Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) after 6 h and

24 h compared to the NaCl group (Fig. 2g). In contrast, a DEX pretreatment (DEX+LPS) did not change the cleaved PARP expression after 6 h or 24 h compared to controls, and also the DEX group showed no such changes, indicating that DEX attenuated the LPS-induced increase in cleaved PARP at both time points. In addition, we found a positive monotonic correlation between the cleaved PARP expression and SQSTM1/p62 expression after 24 h (Fig. 3), suggesting that an impaired autophagic flux might be associated with an increase in the cell death marker cleaved PARP.

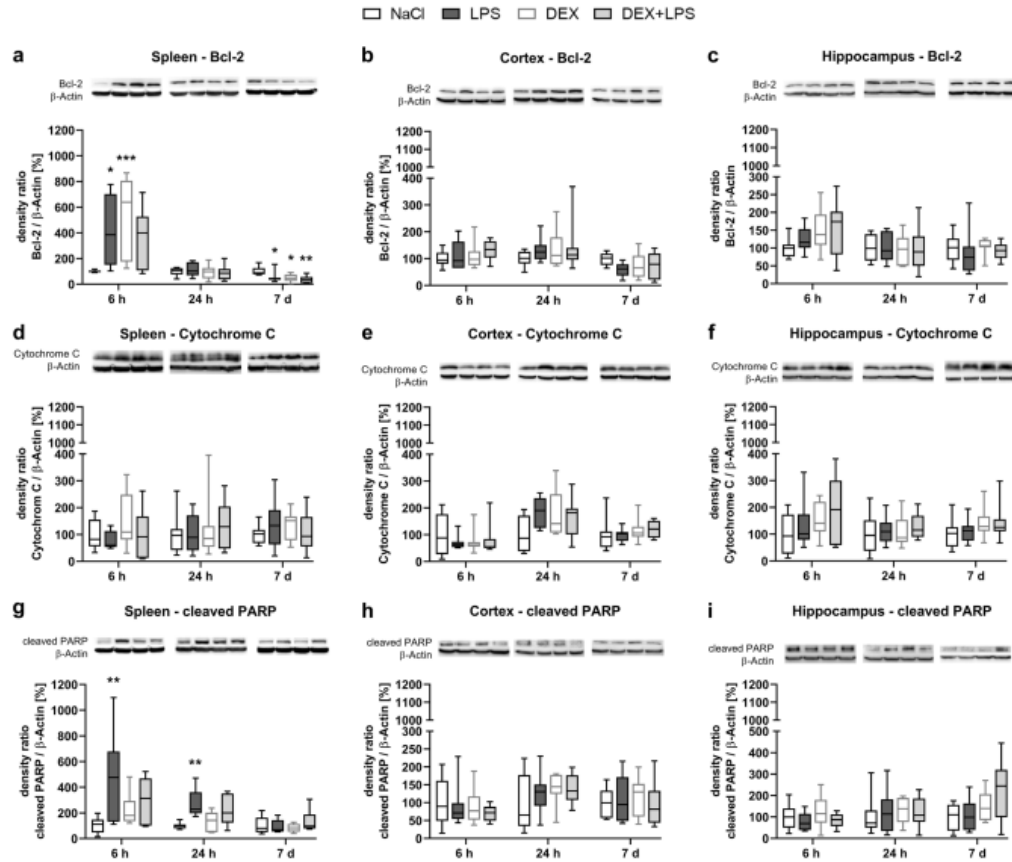


Fig. 2 DEX attenuates PARP cleavage in the spleen. Changes in the anti-apoptotic protein **a-c** Bcl-2 and in the pro-apoptotic proteins **d-f** Cytochrome C and **g-i** cleaved PARP in the spleen and brain were detected by immunoblotting and analysed by densitometric quanti-

fication. Results are shown as boxplots with $n=6-8$ per group and data normalized to levels of NaCl-treated rats (control = 100%). **a-i** * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ in Kruskal–Wallis test, followed by a Dunn’s multiple comparisons post-hoc test vs NaCl group

In contrast to the spleen, we detected no changes in the anti-apoptotic protein Bcl-2 (Fig. 2b, c) nor in any pro-apoptotic protein (Fig. 2e-f, h–i) within the brain.

Both, LPS and DEX, change miRNA expression in the spleen and brain

In addition, we were interested in the role of miRNAs that are known to regulate autophagy in the spleen and brain, to see whether LPS- and DEX-induced effects on autophagy were mediated by these regulatory molecules. Therefore, we measured the expression of six miRNAs, miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-30a-5p, miR-34a-5p, miR-204-5p and miR-Let-7a-5p, all known to affect the autophagic process

(Gu et al. 2020; Morgado et al. 2015; Song et al. 2015; Sun et al. 2017; Wang et al. 2014; Yan et al. 2019).

DEX prevents the LPS-induced decrease in miR-Let-7a-5p and attenuates the decrease of miR-21-5p and miR-204-5p in the spleen

LPS downregulated the expression of three out of six studied miRNAs in the spleen (Fig. 4a-f): it significantly downregulated miR-21-5p (Fig. 4a) and miR-34a-5p expression after 6 h (Fig. 4d) and miR-Let-7a-5p after 24 h and 7 d compared to NaCl control group (Fig. 4f). In contrast, a pretreatment with DEX (DEX+LPS) did not alter the expression of these miRNAs compared

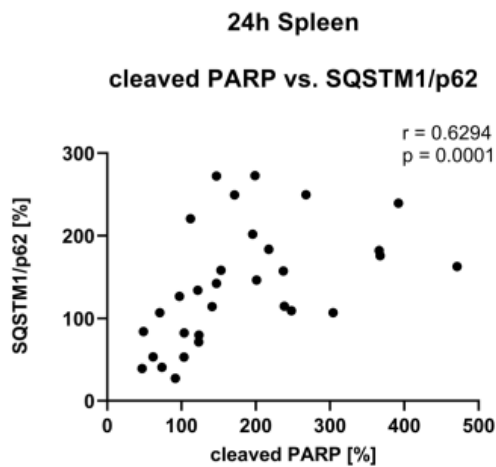


Fig. 3 A positive monotonic correlation was found between PARP cleavage and SQSTM1/p62 after 24 h in the spleen. Results are shown as scatter plots with $n=31$. $p=0.0001$ between splenic cleaved PARP expression vs. SQSTM1/p62 expression after 24 h in Spearman correlation analysis with Spearman $r=0.6294$

to control and, in the case of miR-Let-7a-5p, even significantly increased miRNA expression compared

to LPS after 7 d, indicating that DEX+LPS attenuated or prevented the LPS-induced changes in miRNA expression. Moreover, both, DEX and DEX+LPS, significantly increased and/or decreased the expression of all six investigated miRNAs at different time points: after 6 h, DEX reduced the expression of all miRNAs, except for miR-21-5p compared to control group; after 24 h, DEX reduced the expression of miR-27a-5p, miR-204-5p, and miR-Let-7a-5p compared to controls and DEX+LPS increased the expression of miR-34a-5p compared to the LPS; after 7 d, DEX reduced the expression of miR-21-5p compared to controls and, in addition, DEX+LPS also reduced the expression of miR-21-5p as well as increased the expression of miR-30a-5p, miR-34a-5p, miR-204-5p, and miR-Let-7a-5p compared to LPS and, in the case of miR-34a-5p and miR-204-5p also compared to the control group at this time point.

Furthermore, we conducted correlation analyses, as we were interested whether the changes seen on miRNA level correlated with the changes in autophagy and apoptosis-associated proteins in the spleen. While we found no correlations between miRNAs and autophagy-associated proteins, we found negative monotonic correlations between cleaved PARP and three miRNAs. Cleaved PARP correlated with both, miR-21-5p and

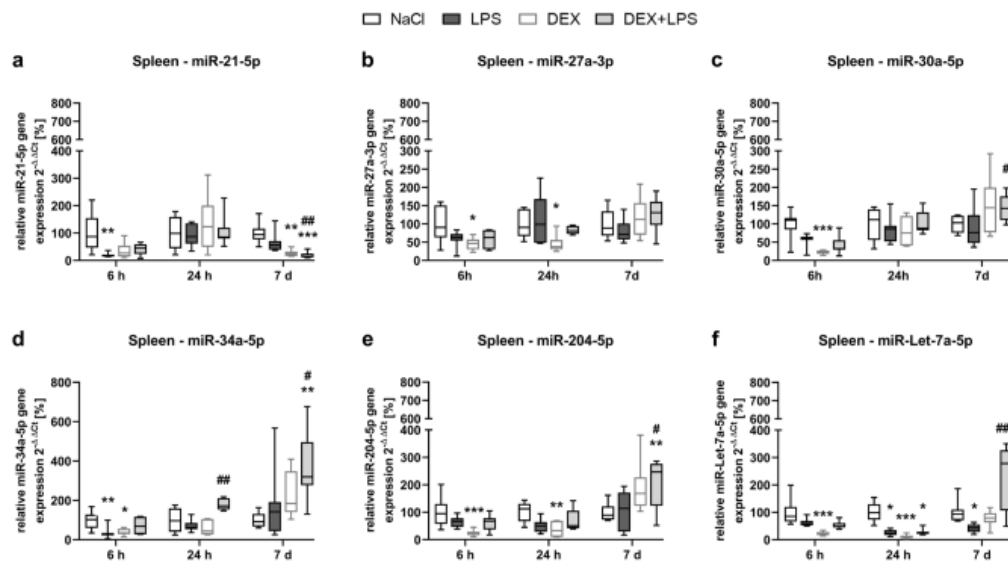


Fig. 4 DEX prevents the LPS-induced decrease in miR-Let-7a-5p and attenuates the decrease in miR-21-5p and miR-34a-5p in the spleen. The changes in the miRNA expression of **a** miR-21-5p, **b** miR-27a-3p, **c** miR-30a-5p, **d** miR-34a-5p, **e** miR-204-5p and **f** miR-Let-7a-5p were detected by Real-Time PCR and quantified according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen 2001). Results are shown

as boxplots with $n=6-8$ per group and data normalized to levels of NaCl-treated rats (control=100%). **a-f*** $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$ in Kruskal–Wallis test, followed by a Dunn's multiple comparisons post-hoc test vs NaCl group; and # $p<0.05$, ## $p<0.01$, and ### $p<0.001$ in Kruskal–Wallis test, followed by a Dunn's multiple comparisons post-hoc test between LPS and DEX + LPS group

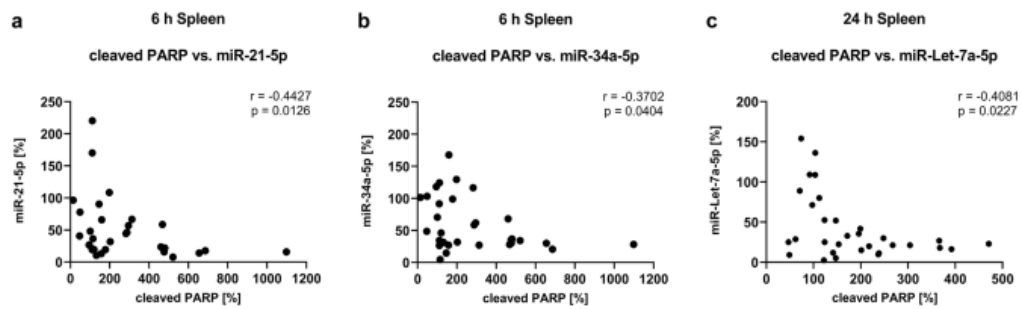


Fig. 5 A negative monotonic correlation was found between PARP cleavage and miR-21-5p and miR-34a-5p after 6 h and miR-Let-7a-5p after 24 h in the spleen. Results are shown as scatter plots with $n=31$. $p < 0.05$ between splenic cleaved PARP expression vs. **a** miR-21-5p

and **b** miR-34a-5p expression after 6 h and **c** miR-Let-7a-5p expression after 24 h in Spearman correlation analysis with Spearman $r = -0.4427$, -0.3702 and -0.4081 respectively

miR-34a-5p, after 6 h (Fig. 5a, b), and with miR-Let-7a-5p after 24 h (Fig. 5c).

DEX does not attenuate the LPS-induced changes in miRNA expression in the cortex

In the cortex, LPS also decreased the expression of three out of the six studied miRNAs (Fig. 6a-f): it significantly

reduced the expression of miR-30a-5p (Fig. 6c), miR-204-5p (Fig. 6e), and miR-Let-7a-5p (Fig. 6f) after 24 h compared to the NaCl control group. In contrast to the spleen, a pretreatment with DEX (DEX+LPS) also reduced the expression of these three miRNAs significantly, indicating that DEX was unable to prevent the LPS-induced downregulations. Similar to the spleen, we found that both, DEX and DEX+LPS, significantly increased

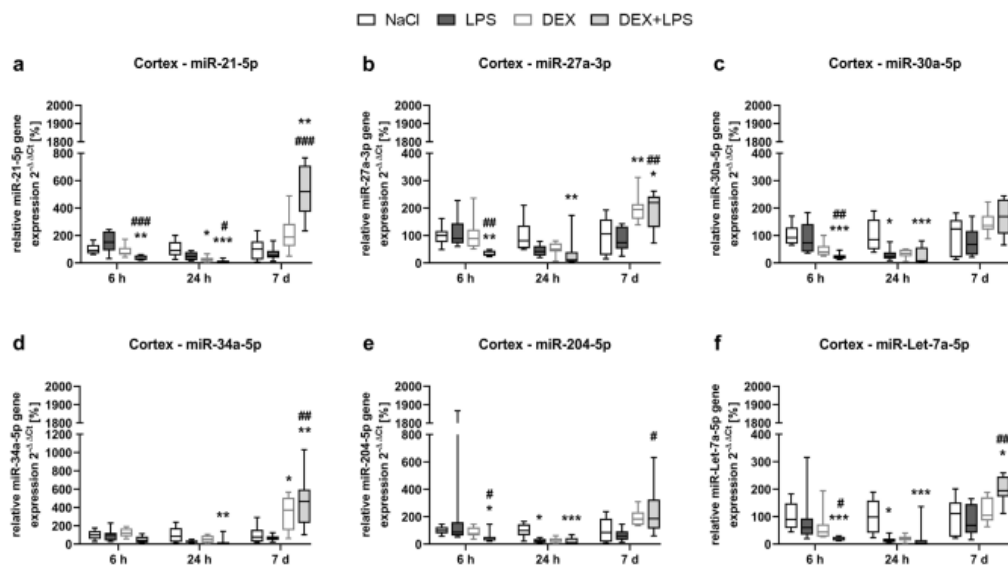


Fig. 6 DEX does not attenuate the LPS-induced changes in miR-30a-5p, miR-204-5p and miR-Let-7a-5p expression in the cortex. The changes in the miRNA expression of **a** miR-21-5p, **b** miR-27a-3p, **c** miR-30a-5p, **d** miR-34a-5p, **e** miR-204-5p and **f** miR-Let-7a-5p were detected by Real-Time PCR and quantified according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen 2001). Results are shown as boxplots

with $n=6-8$ per group and data normalized to levels of NaCl-treated rats (control = 100%). **a-f** * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ in Kruskal–Wallis test, followed by a Dunn's multiple comparisons post-hoc test vs NaCl group; and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ in Kruskal–Wallis test, followed by a Dunn's multiple comparisons post-hoc test between LPS and DEX + LPS group

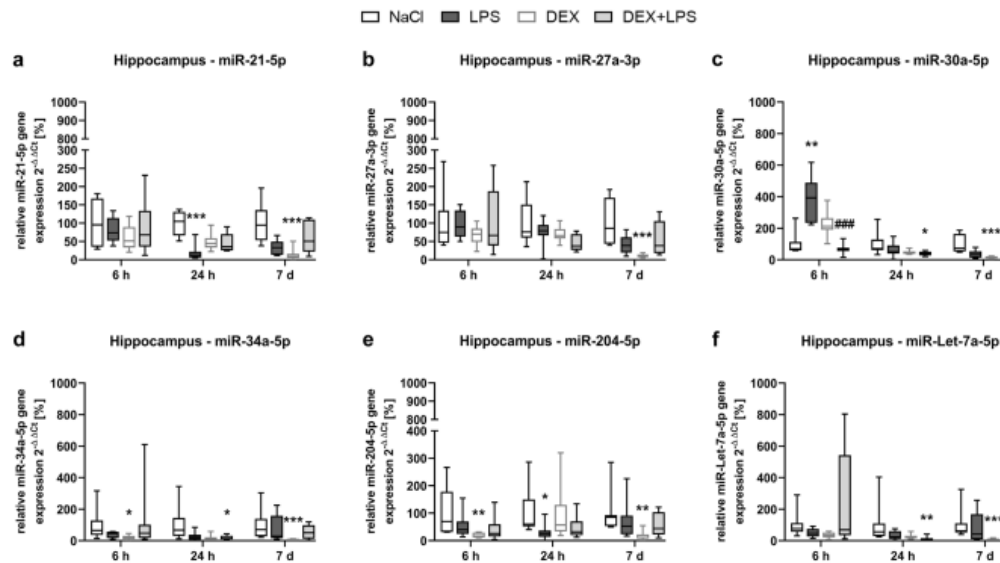


Fig. 7 DEX prevents the LPS-induced increase in miR-30a-5p and attenuates the decrease in miR-21-5p and miR-204-5p in the hippocampus. The changes in the miRNA expression of a miR-21-5p, b miR-27a-3p, c miR-30a-5p, d miR-34a-5p, e miR-204-5p and f miR-Let-7a-5p were detected by Real-Time PCR and quantified according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen 2001). Results are

shown as boxplots with $n=6-8$ per group and data normalized to levels of NaCl-treated rats (control=100%). a-f * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ in Kruskal-Wallis test, followed by a Dunn's multiple comparisons post-hoc test vs NaCl group; and ### $p < 0.001$ in Kruskal-Wallis test, followed by a Dunn's multiple comparisons post-hoc test between LPS and DEX+LPS group

and/or decreased the expression of all investigated miRNAs at different time points: after 6 h, DEX+LPS reduced the expression of all miRNAs except for miR-34a-5p compared to the control and LPS group; after 24 h, DEX reduced the expression of miR-21-5p compared to the control group, while DEX+LPS downregulated miR-21-5p compared to control and LPS group, and also reduced the expression of all other miRNAs compared to control group; and after 7 d, DEX increased the expression of miR-27a-5p and miR-34a-5p compared to controls, while DEX+LPS increased the expression of miR-21-5p, miR-27a-5p, miR-34a-5p and miR-Let-7a-5p compared to control and LPS group, and, in the case of miR-204-5p, compared LPS group. Notably, in the cortex, DEX+LPS induced more significant changes to the miRNA expression than DEX and, similar to the spleen, DEX+LPS often induced a significantly different miRNA expression compared to the LPS group.

DEX prevents LPS-induced increase in miR-30a-5p and attenuates decrease of miR-21-5p and miR-204-5p in the hippocampus

Again, in the hippocampus, LPS up- as well as downregulated the expression of half of the investigated miRNAs

(Fig. 7a-f): it increased the expression of miR-30a-5p after 6 h (Fig. 7c) and decreased the expression of miR-21-5p (Fig. 7a) as well as miR-204-5p (Fig. 7e) after 24 h compared to the NaCl control group. Similar to the spleen and contrary to the cortex, a DEX pretreatment (DEX+LPS) did not alter the expression of miR-21-5p and miR-204-5p after 24 h compared to controls and successfully prevented the LPS-induced increase in miR-30a-5p expression, indicating that DEX+LPS prevented or attenuated the LPS-induced changes in miRNA expression. Similar to the spleen and the cortex, we found that both, DEX and DEX+LPS, significantly increased and/or decreased all investigated miRNAs at different time points: after 6 h, DEX reduced the expression of miR-34a-5p and miR-204-5p compared to control group, while after 24 h, DEX+LPS reduced the expression of miR-30a-5p, miR-34a-5p and miR-Let-7a-5p compared to control group, and after 7 d, DEX reduced the expression of all six investigated miRNAs compared to control group. Contrary to the cortex, DEX modified the miRNA expression more profoundly than LPS or DEX+LPS and there were hardly any significant differences between the DEX+LPS and LPS group in the hippocampus. Furthermore, only within this brain region, LPS was able to upregulate miRNA expression (Fig. 7c).

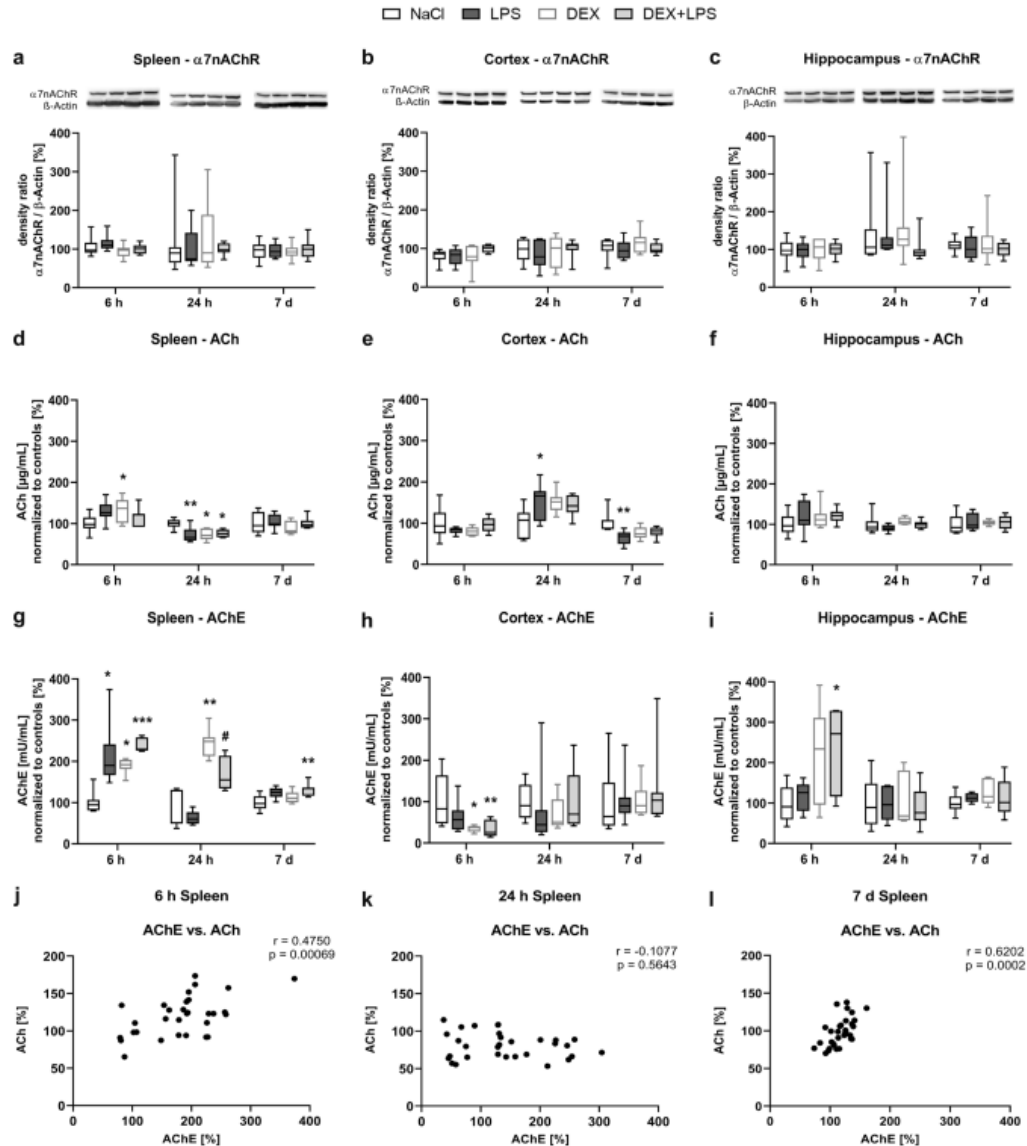


Fig. 8 Both, DEX and LPS change the expression of acetylcholine and the activity of acetylcholinesterase in the spleen and brain. **a-c** Protein expression of α7nAChR was detected by immunoblotting and densitometric quantification. **d-f** Acetylcholine level and **g-i** acetylcholinesterase activity were measured with the Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay. Results are shown as boxplots with $n=6-8$ per group and data normalized to levels of NaCl-treated rats (control=100%). **a-i** * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ in Kruskal–Wallis test, followed by a Dunn’s multiple comparisons post-hoc test vs NaCl group; and # $p < 0.05$ in Kruskal–Wallis test,

followed by a Dunn’s multiple comparisons post-hoc test between LPS and DEX+LPS group. **j-l** correlation analyses of acetylcholinesterase and acetylcholine showing a positive monotonic correlation after 6 h and 7 d, but not after 24 h in the spleen. Results are shown as scatter plots with $n=31-32$. $p < 0.001$ between acetylcholinesterase activity vs. acetylcholine expression after **j** 6 h, $p > 0.05$; after **k** 24 h $p > 0.05$; and after **l** 7 d $p < 0.001$ in Spearman correlation analysis with Spearman $r = 0.4750$, -0.1077 and 0.6202 respectively

Both, DEX and LPS, change the expression of acetylcholine and the activity of acetylcholinesterase in the spleen and brain

Recent studies indicate that an association between the cholinergic anti-inflammatory pathway and the DEX-mediated neuro- and organo-protection might exist (Ding et al. 2019; Zhu et al. 2016). Thus, we tested whether LPS changed molecules of the cholinergic system and whether a DEX pretreatment was able to influence these changes.

We detected no alterations in the protein expression of $\alpha 7nAChR$, neither in the spleen (Fig. 8a), nor in the brain (Fig. 8b, c), but observed changes in ACh expression (Fig. 8d-f) and AChE activity (Fig. 8g-i) in both organs.

In the spleen, the expression of ACh remained at control level in the LPS and DEX+LPS group after 6 h, but DEX significantly increased ACh expression (Fig. 8d). After 24 h, LPS significantly decreased the expression of ACh below control levels, and also DEX and DEX+LPS induced a similar decrease (Fig. 8d). No changes compared to controls were found after 7 d. In contrast to ACh, we detected more pronounced effects of both, LPS and DEX, regarding the AChE activity. In the spleen, LPS significantly increased the AChE activity after 6 h, and also DEX and DEX+LPS upregulated the AChE activity to a similar level compared to controls (Fig. 8g). After 24 h, the increased AChE activity returned to control level in the LPS group. In contrast, AChE activity remained significantly increased in the DEX and DEX+LPS group compared to control and LPS group respectively, indicating that DEX prevented the LPS-induced decrease in AChE activity. After 7 d, AChE activity remained upregulated only in the DEX+LPS group. When correlating AChE and ACh, we found a positive monotonic correlation after 6 h and 7 d (Fig. 8j, l), but not after 24 h (Fig. 8k), which further underlines the AChE activating effect of DEX at this time point.

In the brain, ACh expression changed within the cortex (Fig. 8e), but not within the hippocampus (Fig. 8f). In the cortex, LPS significantly increased the ACh expression after 24 h and decreased it after 7 d compared to controls, whereas DEX and DEX+LPS only showed tendencies of such an increase and decrease respectively. In contrast to the spleen, LPS did not modify the AChE activity in the brain, but only DEX did (Fig. 8h, i). After 6 h, both, DEX and DEX+LPS significantly reduced AChE activity in the cortex compared to control group (Fig. 8h), whereas in the hippocampus the opposite effect was observed, as DEX+LPS significantly increased AChE activity after 6 h (Fig. 8i).

Discussion

This study was conducted to understand the mechanisms behind the DEX-mediated neuro- and organo-protection. We

have previously shown that LPS treatment increased the pro-inflammatory cytokines Interleukin-1 β (IL-1 β) and Tumor necrosis factor- α (TNF- α) as well as upregulated miR-124, miR-132, miR-134 and miR-155 in the hippocampus and cortex, and that DEX prevented this (Paeschke et al. 2017). In the present study, we have now added new insights into the DEX-mediated protection during inflammation by investigating its role in autophagy and cell death as well as its effect on associated miRNAs and the cholinergic system in the spleen and brain.

Neither LPS, nor DEX induced changes in autophagy and apoptosis-associated proteins in the cortex or hippocampus. The missing effect in the brain might indicate that the LPS injection alone was probably not sufficient to actually induce apoptosis, but only to increase pro-inflammatory cytokines, as previously shown (Paeschke et al. 2017). Similar results were observed earlier (Kalb et al. 2013) and thus indicate that a combination of damage-associated molecular patterns (DAMPs) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) may be necessary to strongly impact the brain.

In contrast, both DEX and LPS, had distinctively different effects on such proteins in the spleen. While early on all three treatment options (LPS, DEX and DEX+LPS) increased the expression of the autophagy protein Atg5, which is involved in the elongation process (Mizushima et al. 2011), only in the presence of LPS Atg5 was altered at later time points, indicating that LPS might have had a long-lasting effect on autophagosome formation. However, LPS also impaired the autophagic flux, as indicated by measuring LC3-II and SQSTM1/p62, whereas DEX was able to restore the autophagic flux in the spleen.

The spleen, as the largest secondary lymphoid organ in the body, hosts a wide range of immunological functions (Lewis et al. 2019) and autophagy in turn holds a crucial role within immune cells (Deretic et al. 2013). Murine studies showed that defects in autophagy in the presence of LPS caused an increase in pro-inflammatory cytokines and a higher mortality, whereas pharmacological activation of autophagy reversed both (Harris 2011; Jones et al. 2013). Our results are in line with findings showing that DEX protected the kidney from LPS induced acute kidney injury by upregulating autophagy (Zhao et al. 2020).

Moreover, the apoptosis of immune cells in immune relevant organs is a major hallmark of sepsis pathophysiology and approaches aimed to prevent this are promising therapeutic options (Luan et al. 2015). While both, LPS and DEX, increased and decreased the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 depending on the time point, only LPS also increased PARP cleavage. In contrast, the DEX+LPS-treated animals attenuated PARP cleavage, indicating a possible anti-apoptotic effect of DEX in spleen. Furthermore, as cleaved PARP and SQSTM1/p62 correlated positively in the spleen, our results might point towards the importance

of a proper functioning autophagy in immune cells. Thus, the autophagy restoring effect of DEX holds a promising approach to prevent organ damage. As we did not find any changes on Cytochrome C protein levels, we assumed that the here suspected mechanism was mitochondria-independent. Anti-apoptotic effects of DEX in the spleen were also described by others (Qiao et al. 2009) and were observed in other organs, too (Rong et al. 2017; Zhao et al. 2020).

MicroRNAs are key regulators of autophagy, apoptosis and inflammation (Gaudet et al. 2018; Su et al. 2015). In our study, we investigated six miRNAs, which are all known to regulate autophagy and inflammation or apoptosis, with miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-30a-5p, miR-34a-5p, and miR-204-5p inhibiting various steps of autophagy (Gu et al. 2020; Morgado et al. 2015; Sun et al. 2017; Wang et al. 2014; Yan et al. 2019), and miR-Let-7a and its family members activating this process (Song et al. 2015).

In this study, we found organ-specific effects of LPS on miRNA expression, which DEX was able to prevent or attenuate in the spleen and hippocampus. Although we observed no effects of the differentially regulated miRNAs on autophagy-associated proteins, we detected a negative correlation between the LPS-altered miRNAs in the spleen (miR-21-5p, miR-34a-5p and miR-Let-7a-5p) and the cell death marker cleaved PARP, indicating that these miRNAs might have rather affected inflammation and cell death mechanisms than autophagy in our model.

Along with miR-21, miR-27a, miR-34a, and miR-Let-7a have been described to have anti-inflammatory properties (Gaudet et al. 2018; Jian et al. 2020; Sheedy 2015; Stachurska et al. 2014), whereas miR-30a-5p and miR-204-5p are reported to exert a pro-inflammatory and/or -apoptotic effect (Wang et al. 2014; Yan et al. 2019). miR-21 is a key modulator of inflammation, which is upregulated in activated immune cells to promote the resolution of inflammation (Sheedy 2015) and to protect the CNS from apoptosis (Gaudet et al. 2018). miR-27a is reported to downregulate pro-inflammatory cytokines (Stachurska et al. 2014) and apoptosis (Sabirzhanov et al. 2014). miR-34a also limits an excessive pro-inflammatory response by targeting Notch1 (Jian et al. 2020) and reducing various pro-inflammatory cytokines (Jian et al. 2020), but was also shown to have detrimental effects in the CNS (Chua and Tang 2019). miR-Let-7a and its family members are upregulated in the plasma during the resolution of inflammation (Silva et al. 2018). They provide a negative feedback to limit inflammation (Gaudet et al. 2018) by reducing the expression of pro-inflammatory cytokines and apoptotic proteins (Gaudet et al. 2018).

Thus, the negative correlations we found in the spleen, indicate that LPS might have mediated its detrimental effects by inhibiting the expression of these anti-inflammatory miRNAs, whereas DEX might have attenuated this effect of LPS, as it neither changed the

expression of these miRNAs, nor increased PARP cleavage significantly. Furthermore, the effect of DEX on miRNA expression extended to the brain as well, as it prevented the LPS-mediated increase of the pro-inflammatory miR-30a-5p and attenuated the decrease in miR-21-5p and miR-204-5p in the hippocampus.

Moreover, while LPS mainly downregulated miRNA expression, DEX frequently also upregulated miRNA expression at later time points. Similar modulation patterns were also observed elsewhere: In murine whole blood samples, in which miRNAs were rather down- than upregulated 6 h after an LPS injection (Hsieh et al. 2012) and in a bone injury model, in which miRNA expressions mainly decreased within the acute phase of an inflammation, but increased within the resolving phase (Silva et al. 2018). In light of these findings, our results might point toward an inflammation resolving effect of DEX by promoting miRNA expression.

Interestingly, the effects of DEX on miRNA expression were visible up to 7 days after treatment, demonstrating a long-lasting miRNA modulation, which might have extended the effects of the drug itself, as – with an elimination half-life of about 2 hours – DEX is metabolized relatively fast (Nguyen et al. 2017).

It is also worth noting that we observed DEX-mediated patterns in miRNA expression in all three tissues, indicating that a DEX administration might have altered common upstream factors of these miRNAs. However, as we did not detect such patterns previously (Paeschke et al. 2017), this observation needs further investigations.

The cholinergic anti-inflammatory pathway is a major communication route between the CNS and the immune system. It modulates the immune response through neural inhibition via the activation of the vagus nerve and the release of ACh, which activates the $\alpha 7$ nAChR located on macrophages and other immune cells and in turn regulates the cytokine release (Pavlov et al. 2003). Recent studies indicate that a blockage of the $\alpha 7$ nAChR or a vagotomy vanishes the effects of DEX (Zhu et al. 2016). Therefore, we were interested how inflammation and a prevention with DEX alter the expression of $\alpha 7$ nAChR and ACh as well as the activity of the ACh limiting enzyme AChE.

Both, LPS and DEX, clearly influenced ACh and AChE, but neither changed $\alpha 7$ nAChR expression in any tissue. This is in contrast to other findings, showing an increased expression of this receptor upon DEX treatment (Rong et al. 2017). However, the modulation of $\alpha 7$ nAChR upon an inflammatory stimulus is still controversial, as others also reported a decrease in $\alpha 7$ nAChR expression (Hoover et al. 2020; Lykhmus et al. 2016).

Regardless of the treatment option, the changes in the ACh expression appeared rather similar, whereas the changes in the AChE activity were almost exclusively

attributable to DEX in both organs. Although both, LPS and DEX, initially increased the AChE activity in the spleen, only the presence of DEX induced an enhanced AChE activity after 24 h, which was further emphasized by the missing resonance between ACh and AChE at this time point. Interestingly, in the brain, we found a region-specific opposite effect of DEX on AChE activity, which we need to investigate further. We could not find any reports on how DEX affects AChE activity, but only on how an inflammatory stimulus, such as LPS, affects this enzyme - by decreasing its activity and gene expression in the spleen (Hoover et al. 2020) and cortex (Lykhmus et al. 2016). As AChE is generally seen as a detrimental factor due to its ACh-hydrolysing function, this was interpreted as a support mechanism to strengthen the cholinergic anti-inflammatory pathway. However, in our study, we observed no indications that an increased AChE activity has detrimental effect, as this neither led to a reduced ACh expression, nor to an increase in apoptosis markers. In fact, AChE has been recognized to have diverse roles outside the cholinergic system (Soreq and Seidman 2001). AChE is described to play a role in neurite outgrowth and neuromuscular junction development and has important functions during haematopoiesis, where it regulates the growth of erythrocytes and platelets (Soreq and Seidman 2001). Studies investigating the effect of AChE expression on clinical outcome found that surgery or inflammation induced low serum cholinesterase levels (Kamolz et al. 2002; Muller et al. 2019), which were partially associated with a higher mortality (Kamolz et al. 2002). This suggests that an increased AChE activity might have added to the organo-protective effects of DEX. Furthermore, as $\alpha 7$ nAChR is also activated by choline (Alkondon et al. 1997), it should be considered that an increased AChE activity cannot be regarded as a fully negative regulator of the cholinergic system.

There are several limitations to our study. As we found no direct association between miRNAs and the autophagy-associated proteins, our results emphasize that miRNA-mediated protein regulation is a highly complex process, in which many influencing factors have to be taken into account: 1) one single miRNA is able to regulate up to 100 different target genes and vice versa (Mukherji et al. 2011); 2) the effects of miRNAs on protein output are highly dependent on the miRNA and target mRNA levels within a given tissue (Baek et al. 2008); and 3) miRNA-mediated protein repression is rather modest and thus, such regulations should be considered a fine-tuning rather than an on-off-switch of gene expression (Mukherji et al. 2011). As there are only a few studies on the influence of DEX on these miRNAs (Ha Sen Ta et al. 2019; Xing et al. 2020), more are needed to address how the DEX-induced changes in miRNA expression affect the organism. Furthermore, as we looked at the effects of LPS and DEX on the whole spleen, we still need to clarify the effect of DEX on the type of (immune)

cell. It was previously reported that, although each leukocyte subpopulation is generally able to exhibit a cholinergic phenotype, mainly monocytes/macrophages increased theirs during sepsis and that AChE is mainly located within large cells of the red pulp, indicating that this enzyme is not located on leukocytes, but rather on megakaryocytes (Hoover et al. 2020). As AChE also holds functions outside the cholinergic system, future studies are also needed to understand how DEX affects the other roles of AChE. In addition, we measured the change in expression of the $\alpha 7$ nAChR, but not its activation status. Thus, it is unclear if $\alpha 7$ nAChR was involved in the DEX-mediated effects. Also, the different methodical approaches among studies must be considered. We might have missed the time point at which $\alpha 7$ nAChR expression was modified by our treatment, as some recorded a decrease in the $\alpha 7$ nAChR level after 8 h in the spleen (Hoover et al. 2020), while others found a change of this receptor after 3 days in the brain (Lykhmus et al. 2016). Furthermore, as our earliest observation time point was 6 h, we might have missed the early effects on the immune system induced by LPS and DEX. Other investigations have pointed out that DEX is able to prevent the LPS-induced increase of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β as early as 2 h post injection in the plasma and spleen of mice (Liu et al. 2015). A similar early preventive effect of DEX on the induction of pro-inflammatory cytokines was also observed in the plasma of LPS-treated rats (Taniguchi et al. 2008). However, the different doses and application routes must also be taken into account when comparing such studies. While we used a relatively mild LPS dose (1 mg/kg body weight) and moderate dose of DEX (5 μ g/kg bodyweight), other studies observed those effects under much higher concentrations of LPS and DEX respectively or under a different administration method (e.g. intravenous infusion). Furthermore, as we have previously shown in the same model that the pro-inflammatory cytokine production within the brain was prevented by DEX only after 24 h but not after 6 h, this might indicate that under our conditions the preventive effect of DEX might have needed more time to fully develop. Nonetheless, these effects were observed in the brain, but not the plasma or spleen and thus we cannot draw any conclusions on the effect of DEX in the periphery. Therefore, the early effects of DEX on miRNA expression, autophagy and the cholinergic anti-inflammatory reflex might have been mediated through the rapid effect of DEX on cytokine production within the blood and spleen as indicated by other studies (Liu et al. 2015; Taniguchi et al. 2008). Moreover, as we investigated an $\alpha 2$ -AR agonist and used isoflurane as an anaesthetic, the additional effect of isoflurane must also be taken into account, as volatile anaesthetics have been reported to alter the function of G protein coupled receptors (GPCRs), such as the $\alpha 2$ -AR (Ishizawa 2007). It was shown that the effect of isoflurane anaesthesia was prolonged when G protein signalling was inhibited, indicating a direct action of isoflurane on GPCRs (Icaza et al. 2009) and that isoflurane anaesthesia

resulted in the inhibition of the high-affinity state of several GPCRs including the $\alpha 2$ -AR (Seeman and Kapur 2003). As a preference between ligands and high-affinity states of GPCRs exists (Shalgunov et al. 2019), isoflurane might have weakened the binding of DEX to the $\alpha 2$ -AR by inhibiting the high-affinity state of this GPCR. Lastly, as we only used male rats, sex differences regarding the immune response must also be taken into account when comparing studies (Spychala et al. 2017).

All in all, the herein reported results underline the complex mode of action DEX exerts within an organism after a systemic inflammation. DEX restored the LPS-induced impairments in the autophagic flux in the spleen, prevented and attenuated certain LPS-induced miRNA modifications in the spleen and hippocampus and altered molecules of the cholinergic anti-inflammatory reflex in both, the spleen and brain. In addition, DEX had a general modulating effect on miRNAs associated with autophagy and inflammation, further highlighting the different molecular pathways that DEX modifies during LPS-induced inflammation. Our results add new insights into the working mechanisms of DEX and provide new perspectives for future research on the protective mechanisms of this $\alpha 2$ -AR agonist.

Acknowledgements We thank Birgit Brandt and Jasmin Jende for their excellent technical and experimental assistance. We thank Amelie Stute for her excellent design for the graphical abstract.

Authors' Contributions C.D.S., C.v.H., M.S., and S.E. conceived and designed the experiments; C.v.H., M.S., N.P., S.E., F.N. and W.K. performed the experiments; W.K. analysed the data; C.D.S. contributed reagents/materials/analysis tools; C.D.S., N.L. and A.G.L. carefully revised the manuscript; W.K. wrote the paper.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was supported by grants from the Elsa-Neumann-Scholarship, Berlin.

Availability of Data and Material Any raw data related to this manuscript may be requested from the corresponding author.

Declarations

Ethics Approval All animal experiments were approved and performed in accordance with the guidelines of the Charité—Universitätsmedizin Berlin, Germany and the national ethic principles (registration no. G 0145/13, 1 July 2013).

Conflict of Interest All authors have read the journal's policy on disclosure of potential conflicts of interest and have none to declare.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated

otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Alkondon M, Pereira EF, Cortes WS, Maelicke A, Albuquerque EX (1997) Choline is a selective agonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci* 9:2734–2742. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01702.x>
- Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455:64–71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>
- Balcells I, Cirera S, Busk PK (2011) Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol* 11:70. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-70>
- Busk PK (2014) A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics* 15:29. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-29>
- Chua CEL, Tang BL (2019) miR-34a in Neurophysiology and Neuropathology. *J Mol Neurosci* 67:235–246. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1231-y>
- Dardalas I et al (2019) Dexmedetomidine effects in different experimental sepsis in vivo models. *Eur J Pharmacol* 856:172401. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.05.030>
- Deretic V, Saitoh T, Akira S (2013) Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 13:722–737. <https://doi.org/10.1038/nri3532>
- Ding M, Chen Y, Luan H, Zhang X, Zhao Z, Wu Y (2019) Dexmedetomidine Reduces Inflammation in Traumatic Brain Injury by Regulating the Inflammatory Responses of Macrophages and Splenocytes *Exp Ther Med* 18:2323–2331. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7790>
- Endesfelder S, Makki H, von Haefen C, Spies CD, Bruhrer C, Sifringer M (2017) Neuroprotective effects of dexmedetomidine against hyperoxia-induced injury in the developing rat brain. *PLoS One* 12:e0171498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171498>
- Feng Y, Yao Z, Klionsky DJ (2015) How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 25:354–363. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.02.002>
- Gaudet AD, Fonken LK, Watkins LR, Nelson RJ, Popovich PG (2018) MicroRNAs: Roles in Regulating Neuroinflammation. *Neuroscientist* 24:221–245. <https://doi.org/10.1177/1073858417721150>
- Gu Y, Fei Z, Zhu R (2020) miR-21 modulates cisplatin resistance of gastric cancer cells by inhibiting autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Anticancer Drugs* 31:385–393. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000886>
- Ha Sen Ta N, Nuo M, Meng QT, Xia ZY (2019) The Pathway of Let-7a-1/2-3p and HMGB1 Mediated Dexmedetomidine Inhibiting Microglia Activation in Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury Mice. *J Mol Neurosci* 69:106–114. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01338-4>
- Harris J (2011) Autophagy and Cytokines *Cytokine* 56:140–144. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.08.022>
- Hoover DB et al (2020) Cholinergic leukocytes in sepsis and at the neuroimmune junction in the spleen. *Int Immunopharmacol* 81:106359. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106359>
- Hsieh CH et al (2012) Whole blood-derived microRNA signatures in mice exposed to lipopolysaccharides. *J Biomed Sci* 19:69. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-69>
- Icaza EE, Huang X, Fu Y, Neubig RR, Baghdoyan HA, Lydic R (2009) Isoflurane-induced changes in righting response and breathing

- are modulated by RGS proteins. *Anesth Analg* 109:1500–1505. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3181ba7815>
- Ishizawa Y (2007) Mechanisms of anesthetic actions and the brain. *J Anesth* 21:187–199. <https://doi.org/10.1007/s00540-006-0482-x>
- Jakob SM et al (2012) Dexmedetomidine vs midazolam or propofol for sedation during prolonged mechanical ventilation: two randomized controlled trials. *JAMA* 307:1151–1160. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.304>
- Jian YP et al (2020) MicroRNA-34a suppresses neuronal apoptosis and alleviates microglia inflammation by negatively targeting the Notch pathway in spinal cord injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 24:1420–1427. https://doi.org/10.26355/eurrev_202002_20199
- Jones SA, Mills KH, Harris J (2013) Autophagy and Inflammatory Diseases *Immunol Cell Biol* 91:250–258. <https://doi.org/10.1038/icb.2012.82>
- Kalb A et al (2013) Acetylcholinesterase inhibitors reduce neuroinflammation and -degeneration in the cortex and hippocampus of a surgery stress rat model. *PLoS One* 8:e62679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062679>
- Kamoliz LP, Andel H, Greher M, Ploner M, Meissl G, Frey M (2002) Serum cholinesterase activity reflects morbidity in burned patients. *Burns* 28:147–150. [https://doi.org/10.1016/s0305-4179\(01\)00091-2](https://doi.org/10.1016/s0305-4179(01)00091-2)
- Kuballa P, Nolte WM, Castoreno AB, Xavier RJ (2012) Autophagy and the immune system. *Annu Rev Immunol* 30:611–646. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074948>
- Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC (2019) Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol* 4. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085>
- Liu Z et al (2015) The Role of Spleen in the Treatment of Experimental Lipopolysaccharide-Induced Sepsis with Dexmedetomidine. *Springerplus* 4:800. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1598-y>
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Method Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luan YY, Yao YM, Xiao XZ, Sheng ZY (2015) Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. *J Interferon Cytokine Res* 35:17–22. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0069>
- Lykhmus O et al (2016) Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain. *Front Mol Neurosci* 9:19. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00019>
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:741–752. <https://doi.org/10.1038/nrm2239>
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
- Morgado AL et al (2015) MicroRNA-34a Modulates Neural Stem Cell Differentiation by Regulating Expression of Synaptic and Autophagic Proteins. *Mol Neurobiol* 51:1168–1183. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8794-6>
- Mukherji S, Ebert MS, Zheng GX, Tsang JS, Sharp PA, van Oudenaarden A (2011) MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nat Genet* 43:854–859. <https://doi.org/10.1038/ng.905>
- Muller A et al (2019) Relevance of peripheral cholinesterase activity on postoperative delirium in adult surgical patients (CESARO): A prospective observational cohort study. *Eur J Anaesthesiol* 36:114–122. <https://doi.org/10.1097/EJA.0000000000000888>
- Nguyen V, Tiemann D, Park E, Salehi A (2017) Alpha-2 Agonists. *Anesthesiol Clin* 35:233–245. <https://doi.org/10.1016/j.anclin.2017.01.009>
- Nixon RA (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* 19:983–997. <https://doi.org/10.1038/nm.3232>
- Ntalouka MP, Arnaoutoglou E, Tzimas P (2018) Postoperative Cognitive Disorders: an Update *Hippokratia* 22:147–154
- Paeschke N, von Haefen C, Endesfelder S, Sifringer M, Spies CD (2017) Dexmedetomidine Prevents Lipopolysaccharide-Induced MicroRNA Expression in the Adult Rat Brain. *Int J Mol Sci* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18091830>
- Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ (2003) The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med* 9:125–134
- Plaza-Zabala A, Sierra-Torre V, Sierra A (2017) Autophagy and Microglia: Novel Partners in Neurodegeneration and Aging. *Int J Mol Sci* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18030598>
- Puleston DJ, Simon AK (2014) Autophagy in the Immune System. *Immunology* 141:1–8. <https://doi.org/10.1111/imm.12165>
- Qiao H, Sanders RD, Ma D, Wu X, Maze M (2009) Sedation improves early outcome in severely septic Sprague Dawley rats. *Crit Care* 13:R136. <https://doi.org/10.1186/cc8012>
- Rong H et al (2017) The effects of dexmedetomidine pretreatment on the pro- and anti-inflammation systems after spinal cord injury in rats. *Brain Behav Immun* 64:195–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.03.006>
- Sabirzhanov B et al (2014) Downregulation of miR-23a and miR-27a following experimental traumatic brain injury induces neuronal cell death through activation of proapoptotic Bcl-2 proteins. *J Neurosci* 34:10055–10071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1260-14.2014>
- Saxena S, Maze M (2018) Impact on the brain of the inflammatory response to surgery. *Presse Med* 47:e73–e81. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2018.03.011>
- Seeman P, Kapur S (2003) Anesthetics inhibit high-affinity states of dopamine D2 and other G-linked receptors. *Synapse* 50:35–40. <https://doi.org/10.1002/syn.10221>
- Shalgunov V, van Waarde A, Booijs J, Michel MC, Dierckx R, Elsinga PH (2019) Hunting for the high-affinity state of G-protein-coupled receptors with agonist tracers: Theoretical and practical considerations for positron emission tomography imaging. *Med Res Rev* 39:1014–1052. <https://doi.org/10.1002/med.21552>
- Shao BZ et al (2017) Autophagy Plays an Important Role in Anti-inflammatory Mechanisms Stimulated by Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Front Immunol* 8:553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00553>
- Sheedy FJ (2015) Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol* 6:19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00019>
- Silva AM et al (2018) Profiling the circulating miRnome reveals a temporal regulation of the bone injury response. *Theranostics* 8:3902–3917. <https://doi.org/10.7150/thno.24444>
- Song J, Oh Y, Lee JE (2015) miR-Let7A Modulates Autophagy Induction in LPS-Activated Microglia. *Exp Neurobiol* 24:117–125. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.2.117>
- Soreq H, Seidman S (2001) Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2:294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>
- Spychala MS, Honarpisheh P, McCullough LD (2017) Sex differences in neuroinflammation and neuroprotection in ischemic stroke. *J Neurosci Res* 95:462–471. <https://doi.org/10.1002/jnr.23962>
- Stachurska A, Zorro MM, van der Sijde MR, Withoff S (2014) Small and Long Regulatory RNAs in the Immune System and Immune Diseases *Front Immunol* 5:513. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00513>
- Su P, Zhang J, Wang D, Zhao F, Cao Z, Aschner M, Luo W (2016) The role of autophagy in modulation of neuroinflammation in microglia. *Neuroscience* 319:155–167. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.035>

- Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q (2015) MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget* 6:8474–8490. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3523>
- Sun L et al (2017) Neuroprotective effects of miR-27a against traumatic brain injury via suppressing FoxO3a-mediated neuronal autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 482:1141–1147. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.001>
- Taniguchi T, Kurita A, Kobayashi K, Yamamoto K, Inaba H (2008) Dose- and time-related effects of dexmedetomidine on mortality and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats. *J Anesth* 22:221–228. <https://doi.org/10.1007/s00540-008-0611-9>
- Turunen H, Jakob SM, Ruokonen E, Kaukonen KM, Sarapohja T, Apajasalo M, Takala J (2015) Dexmedetomidine versus standard care sedation with propofol or midazolam in intensive care: an economic evaluation. *Crit Care* 19:67. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0787-y>
- von Haefen C et al (2018) Physostigmine Restores Impaired Autophagy in the Rat Hippocampus after Surgery Stress and LPS Treatment. *J Neuroimmune Pharmacol* 13:383–395. <https://doi.org/10.1007/s11481-018-9790-9>
- Wang P et al (2014) Down-regulation of miRNA-30a alleviates cerebral ischemic injury through enhancing beclin 1-mediated autophagy. *Neurochem Res* 39:1279–1291. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1310-6>
- Xing N et al (2020) Dexmedetomidine improves propofol-induced neuronal injury in rat hippocampus with the involvement of miR-34a and the PI3K/Akt signaling pathway. *Life Sci* 247:117359. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117359>
- Yan L, Shi E, Jiang X, Shi J, Gao S, Liu H (2019) Inhibition of MicroRNA-204 Conducts Neuroprotection Against Spinal Cord Ischemia. *Ann Thorac Surg* 107:76–83. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2018.07.082>
- Zhao Y et al (2020) Dexmedetomidine Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury by Enhancing Autophagy Through Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Front Pharmacol* 11:128. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00128>
- Zhu YJ, Peng K, Meng XW, Ji FH (2016) Attenuation of neuroinflammation by dexmedetomidine is associated with activation of a cholinergic anti-inflammatory pathway in a rat tibial fracture model. *Brain Res* 1644:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.074>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8 Komplette Publikationsliste

- **Kho W**, von Haefen C, Paeschke N, Nasser F, Endesfelder S, Sifringer M, González-López A, Lanzke N, Spies CD. Dexmedetomidine Restores Autophagic Flux, Modulates Associated microRNAs and the Cholinergic Anti-inflammatory Pathway upon LPS-Treatment in Rats. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2021 Aug 6. doi: 10.1007/s11481-021-10003-w. PMID: 34357471
 - Journal Impact Factor: 4,113
- Hamzei Taj S, **Kho W**, Riou A, Wiedermann D, Hoehn M. MiRNA-124 induces neuroprotection and functional improvement after focal cerebral ischemia. *Biomaterials.* 2016 Jun;91:151-165. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.03.025. Epub 2016 Mar 19. PMID: 27031810.
 - Journal Impact Factor: 10,317
- Hamzei Taj S, **Kho W**, Aswendt M, Collmann FM, Green C, Adamczak J, Tennstaedt A, Hoehn M. Dynamic Modulation of Microglia/Macrophage Polarization by miR-124 after Focal Cerebral Ischemia. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2016 Dec;11(4):733-748. doi: 10.1007/s11481-016-9700-y. Epub 2016 Aug 18. PMID: 27539642.
 - Journal Impact Factor: 4,113

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir diese Promotionsarbeit ermöglicht, mich dabei begleitet und unterstützt haben und ohne die diese Promotionsarbeit nicht zustande gekommen wäre.

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Claudia Spies bedanken, die mir dieses interessante Thema bereitgestellt hat und mir die Möglichkeit gegeben hat an der Klinik für Anästhesiologie m.S. operative Intensivmedizin der Charité diese Promotion durchzuführen. Zudem möchte ich mich auch ganz herzlich bei der Nachwuchsförderung des Landes Berlins für die finanzielle Unterstützung durch das Elsa-Neumann-Stipendium bedanken, denn ohne diese finanzielle Unterstützung wäre mein Promotionsvorhaben nicht möglich gewesen. Dabei gilt ein besonderer Dank Frau Dorothea Haselow, die mich bei der Antragstellung und jeglichen Fragen immer sehr unterstützt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner zweiten Betreuerin Dr. Clarissa von Haefen für die hervorragende Betreuung und Einarbeitung während der gesamten Zeit. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können. Der ständige wissenschaftliche und persönliche Austausch und die so offene Kommunikation haben maßgeblich dazu beigetragen stets motiviert und voller Begeisterung zu forschen!

Zudem möchte ich mich auch ganz herzlich bei Dr. Nadine Paeschke für die tolle Einarbeitung bedanken und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für alle Fragen hatte. Die zahlreichen hilfreichen Diskussionen haben immer Spaß gemacht und mich immer weitergebracht. Außerdem bedanke ich mich auch bei Frau Nadine Lanzke und Herrn Dr. Adrian Lopez-Gozales für die immer netten Hilfestellungen und Diskussionen sowie auch bei allen anderen Kolleg:innen des Labors der experimentellen Anästhesie für die tolle Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich immer bei all meinen Vorhaben bedingungslos unterstützt hat und meinen Freunden, die immer für mich da waren, wenn es mal nicht rund lief, sowie nicht zuletzt vor allem meinem Freund, Simon Delp, der mich immer dazu ermutigt und unterstützt hat, meine Ziele zu verfolgen und mir während der gesamten Promotionszeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne euch alle wäre ich nie so weit gekommen.