

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie,
Molekulare Diagnostik
des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz

Die Rolle der microRNA-15b in der Pathogenese des experimentellen allergischen Asthma bronchiale



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Charlotte Michaela Müllers
aus Koblenz

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
27.07.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. med. Harald Renz

1. Korreferent: Prof. Dr. med. Bernd Schmeck

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie,
Molekulare Diagnostik
des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz

Die Rolle der microRNA-15b in der Pathogenese des experimentellen allergischen Asthma bronchiale



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Charlotte Michaela Müllers
aus Koblenz

Marburg, 2016

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Asthma bronchiale	1
1.1.1	Definition, Epidemiologie und Klinik	1
1.1.2	Ätiopathogenese	2
1.1.2.1	Ätiologie.....	2
1.1.2.2	Pathophysiologie	3
1.1.3	Therapie.....	5
1.2	microRNAs.....	6
1.2.1	microRNA-Biogenese	6
1.2.2	Die microRNA-Forschung in der klinischen Anwendung.....	8
1.3	Epigenetik des Asthma bronchiale: Neue Forschungsansätze	9
1.4	Ziele der Arbeit.....	11
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material.....	12
2.1.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	12
2.1.2	Zelllinien.....	12
2.1.3	Versuchstiere	13
2.1.4	Kits	13
2.1.5	Antikörper, Fluorochrome und Interleukine	13
2.1.6	microRNAs, Antagomirs und Primer	14
2.1.6.1	microRNAs und Antagomirs.....	14
2.1.6.2	Primer microRNAs.....	14
2.1.6.3	Primer messenger RNAs	14
2.1.7	Plasmide	15
2.1.8	Chemikalien und Reagenzien	15
2.1.9	Medien und Puffer	16
2.2	Geräte und Software	17
2.2.1	Geräte	17
2.2.2	Software.....	17
2.2.3	Datenbanken	18
2.3	Methoden	19
2.3.1	Zellkultur	19
2.3.1.1	Passagieren der Zellen.....	19
2.3.1.2	Bestimmung der Zellzahl	19
2.3.2	Transfektion der HEK293 Zellen	19
2.3.2.1	Transfektion des IFN- γ 3'-UTR Plasmids.....	20
2.3.2.2	Transfektion der microRNAs und Antagomirs	20
2.3.3	Dual-Luciferase® Reporter Assay.....	20
2.3.3.1	Prinzip	20

2.3.3.2	Durchführung	22
2.3.3.3	IFN- γ 3'-UTR Plasmid	22
2.3.4	Mutation des IFN- γ 3'-UTR Plasmids	22
2.3.5	Versuchstiere und Tierversuchsprotokolle	23
2.3.5.1	Versuchstiere	23
2.3.5.2	Zellisolation (Milz)	23
2.3.5.3	Zellisolation (Lymphknoten)	24
2.3.6	Isolation von CD4+ Zellen mittels MicroBeads	24
2.3.6.1	Isolation naiver T-Helferzellen	24
2.3.6.2	Isolation von T-Helferzellen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge	24
2.3.7	<i>In vitro</i> Differenzierung naiver T-Helferzellen	25
2.3.8	Transfektion muriner T-Helferzellen	26
2.3.8.1	Transfektionsoptimierung	26
2.3.8.2	Transfektion muriner T-Helferzellen mit microRNA-15b und anti-microRNA-15b	27
2.3.9	RNA Isolierung	27
2.3.9.1	Konzentrationsbestimmung	28
2.3.9.2	Überprüfen der Integrität	28
2.3.10	Synthese komplementärer DNA	28
2.3.10.1	messenger RNA	29
2.3.10.2	microRNA	29
2.3.11	Real-Time PCR	30
2.3.11.1	messenger RNA	30
2.3.11.2	microRNA	31
2.3.12	Durchflusszytometrie	31
2.3.13	ELISA	32
2.4	Statistik	32
3	ERGEBNISSE	33
3.1	Die microRNA-15b und IFN-γ: Zielgenanalyse und experimentelle Validierung	33
3.1.1	<i>In silico</i> Analyse zeigt IFN- γ als Zielgen der microRNA-15b	33
3.1.2	Kotransfektion von microRNA-15b und IFN- γ 3'-UTR resultieren in reduzierter Reporterenzymaktivität	35
3.1.3	Kotransfektion von Antagomirs in gleicher Konzentration kann microRNA-Effekt nicht inhibieren	38
3.1.4	Reduzierte Luciferaseaktivität nach Mutation der vorhergesagten Bindungsstelle	39
3.2	Expressionslevel und -kinetik der microRNA-15b in <i>in vitro</i> differenzierten T-Helferzellen	42
3.2.1	Protokoll zur <i>in vitro</i> Differenzierung von T-Helferzellen zeigt deutliche Expression von Leitzytokinen nach sechs Tagen	42
3.2.2	Erhöhte Expression der microRNA-15b während der <i>in vitro</i> Differenzierung von T-Helferzellen	44
3.3	Expression von IFN-γ in T-Helferzellen nach Transfektion mit microRNA-15b und anti-microRNA-15b	46
3.3.1	HiPerFect als Alternative für die Transfektion von T-Helferzellen	46
3.3.2	Transfektion von <i>in vitro</i> differenzierten T-Helferzellen	52
3.3.3	Transfektion von T-Helferzellen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge	54

4	DISKUSSION	56
4.1	MicroRNA-Expressions-Arrays als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen	56
4.2	Die Expression der microRNA-15b während der <i>in vitro</i> Differenzierung von T-Helferzellen	57
4.3	<i>In silico</i> Suche von microRNA-Zielgenen.....	59
4.4	Validierung von IFN- γ als Zielgen der microRNA-15b	61
4.5	Transfektion von primären T-Helferzellen: Die Lipofektion als Alternative zur Nukleofektion.....	63
4.6	Untersuchung der Effektorfunktion einer microRNA	67
4.7	Die microRNA-15b.....	70
5	ZUSAMMENFASSUNG	73
6	ABSTRACT	75
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	79
	TABELLENVERZEICHNIS	80
	LITERATURVERZEICHNIS	81
	LEBENS LAUF	93
	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	94
	DANKSAGUNG	95
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	96

1 EINLEITUNG

1.1 Asthma bronchiale

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Klinik

Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, deren Bedeutung für die öffentliche Gesundheit angesichts steigender Prävalenzzahlen zu einem immer größeren Problem zu werden droht (Robert Koch-Institut (Hrsg.) 2014, 2012). In Deutschland ist Asthma bronchiale (im Folgenden AB) die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter und weist, auch wenn viele Fälle mit zunehmendem Alter sistieren, im Erwachsenenalter weiterhin eine Prävalenz von 5% der deutschen Gesamtbevölkerung auf (Bundesärztekammer et al 2014).

Die Globale Initiative für Asthma (GINA) definiert in ihrem seit 1993 erscheinenden *GINA strategy report* AB wie folgt:

“Asthma is a heterogeneous disease, usually characterized by chronic airway inflammation. It is defined by the history of respiratory symptoms such as wheeze, shortness of breath, chest tightness and cough that vary over time and in intensity, together with variable expiratory airflow limitation.” (Reddel et al 2014)

In dieser Definition finden sich zwei Hauptcharakteristika, die chronische Entzündungsreaktion, kombiniert mit einer (partiell) reversiblen, anfallsartig auftretenden Obstruktion der Atemwege. Diese Obstruktion entsteht durch eine Kombination aus erhöhter Mukusproduktion mit Mukostase, Spasmen der glatten Bronchialmuskulatur und einem Schleimhautödem. In der deutschen S3-Leitlinie (Bundesärztekammer et al 2014) findet sich zudem ein weiterer wichtiger Aspekt, welcher die Definition komplettiert: Zusätzlich zu der im *GINA report* genannten chronischen Entzündung und variierenden Obstruktion der Atemwege wird AB dort außerdem über eine unspezifische bronchiale Hyperreagibilität definiert, welche auch ohne Allergenpräsenz zu Asthma-typischen Symptomen führen kann.

Klinisch zeichnet sich AB durch die erwähnte anfallsweise auftretende Obstruktion der Atemwege aus, die - je nach Unterform (s.u.) - durch verschiedene Ursachen ausgelöst wird. Der akute Asthmaanfall beginnt häufig mit trockenem Reizhusten, gefolgt von Atemnot, Tachypnoe, Tachykardie und inspiratorischem Stridor, klinisch kann der

Schweregrad dabei zwischen leichten und lebensbedrohlichen Anfällen variieren. Bei schweren Asthmaformen oder chronischer Allergenexposition können Patienten jedoch auch dauerhaft unter Symptomen leiden.

1.1.2 Ätiopathogenese

1.1.2.1 Ätiologie

Man unterscheidet verschiedene Unterformen des AB, das allergische (extrinsische) und das nicht-allergische (intrinsische) AB (Reddel et al 2014). Das allergische AB entsteht meist bereits im Kindesalter, die betroffenen Patienten sind häufig im Sinne einer Atopie vorbelastet und leiden an weiteren assoziierten Erkrankungen, beispielsweise der allergischen Rhinitis oder atopischen Dermatitis. Das nicht-allergische AB betrifft hingegen vorwiegend Erwachsene und hat unterschiedliche Auslöser wie virale Infekte, Analgetika (v.a. Acetylsalicylsäure), β -Blocker oder physikalische Reize (Anstrengung oder Kälte). In den meisten Fällen liegt jedoch eine Mischform vor, viele Asthmatiker reagieren sowohl auf typische Allergene als auch auf andere Auslösefaktoren des nicht-allergischen AB. Die vorliegende Dissertation konzentriert sich auf das allergische AB.

Das allergische AB entsteht am ehesten multifaktoriell durch ein Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen (Albert et al. 2012). Am Anfang steht dabei die Sensibilisierung gegen ein oder mehrere aerogene Allergene, wie Tierhaare, Hausstaubmilbenkot, Pilzsporen oder Pollen und die Entwicklung einer unspezifischen bronchialen Hyperreagibilität. Im Rahmen der Sensibilisierung werden spezifische Immunglobulin E (IgE) produzierende Plasmazellen gebildet. Dennoch entwickeln bei Weitem nicht alle Patienten mit einer erhöhten Produktion von Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern oder bronchialer Hyperreagibilität auch eine klinisch manifeste Allergie oder gar ein allergisches AB (Porsbjerg et al. 2006). Welche Faktoren auf dem Boden einer Allergensensibilisierung zu der Ausbildung einer Allergie führen, ist weiterhin nicht ausreichend geklärt.

Eine familiäre Atopiebelastung und männliches Geschlecht sind mit einer erhöhten Inzidenz von AB im Kindesalter assoziiert (Nordlund et al. 2014), ebenso erhöhen Adipositas im Kindesalter (Brüske et al. 2014) und maternale Nikotinexposition in der Schwangerschaft das Risiko zu erkranken (Grabhenrich et al. 2014; Simons et al. 2014).

Ein partieller Erklärungsansatz für die in den letzten Jahrzehnten angestiegene Prävalenz von AB lässt sich möglicherweise in der zunehmenden Exposition mit volatilen Schadstoffen finden. Bei bereits bestehendem AB führt eine erhöhte Exposition mit Industrieabgasen, Feinstaub und Dieselrußpartikeln zu vermehrten Exazerbationen der Erkrankung. Eine kindliche oder maternale Exposition erhöht jedoch auch bereits das Risiko an AB zu erkranken (Ho 2010). Diskutierte Mechanismen sind eine Schädigung des respiratorischen Epithels mit einer erhöhten Durchlässigkeit für Allergene und einer nachfolgend gesteigerten Sensibilisierungsrate (Holgate 2011), sowie eine möglicherweise erhöhte Atopieneigung und modifizierte Immunreaktion durch eine eventuelle Adjuvanswirkung von Schadstoffen (Latzin 2013; Guarnieri und Balmes 2014). Ein weiterer diskutierter Ansatz zur Erklärung der in den vergangenen Jahrzehnten gestiegenen Prävalenz von AB ist die sogenannte „Hygiene-Hypothese“ (Brooks et al. 2013). Diesem Ansatz liegt der Gedanke zu Grunde, dass Kinder in einem urbanen Umfeld weniger mit mikrobieller Flora in Kontakt kommen, woraus eine unzureichende Stimulation des kindlichen Immunsystems und eine erhöhte Rate von Allergien gegen unschädliche Umweltantigene resultieren soll.

1.1.2.2 Pathophysiologie

Aufgrund der Erkenntnisse der vergangenen Jahre wird das Modell der zwei klinischen Phänotypen allergisches und nicht-allergisches AB zunehmend verlassen. Mit dem stetig wachsenden Wissen über die Heterogenität des Krankheitsbildes erscheinen neue Kategorien für sogenannte Endotypen, welche die grundlegenden pathogenetischen Mechanismen von einzelnen Phänotypen berücksichtigen, sinnvoll (Agache et al. 2012). Die Pathogenese von AB wurde lange Zeit auf die Dominanz von T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2 -Zellen) in der Immunreaktion reduziert. Dass dieser Ansatz zu kurz greift, zeigen neue Publikationen, die sich beispielsweise mit der Rolle von weiteren Zellpopulationen wie regulatorischen T-Zellen (T_{reg} -Zellen) und T-Helferzellen vom Typ 9 (T_H9 -Zellen) und 17 (T_H17 -Zellen) in der Pathogenese des AB beschäftigen (Lloyd und Hessel 2010; Holgate und Polosa 2008). Eine allgemeingültige Klassifikation für solche Endotypen liegt noch nicht vor, eine grundlegende Unterscheidung in sogenannte $T_H2-high$ - und T_H2-low Typen wird jedoch bereits von vielen Autoren vorgenommen (Fajt und Wenzel 2014; Bradding und Green 2010). Da die vorliegende Dissertation das allergische AB zum Thema hat, welches zu den $T_H2-high$ Endotypen gezählt wird, soll im Folgenden auf die Erläuterung der

Pathogenese der weiteren Typen verzichtet und zwecks besserer Lesbarkeit weiterhin die Bezeichnung allergisches oder extrinsisches AB verwendet werden.

Sensibilisierung

Das allergische AB ist eine Typ-I-Allergie vom Soforttyp und wird durch den Kontakt mit aerogenen Allergenen, wie Pollen oder Pilzsporen, ausgelöst (Albert et al. 2012). Diese gelangen unterhalb einer Größe von 2 μm in die unteren Atemwege und werden dort von intraepithelialen respiratorischen dendritischen Zellen (DC) phagozytiert (Strober et al. 2009). Diese beginnen nach Allergenkontakt ihre Migration in die regionalen Lymphknoten, um Fragmente des phagozytierten Antigens naiven T-Helferzellen (T_{H0}) mittels ihres *major histocompatibility complex II* (MHC-II) zu präsentieren (Holgate und Polosa 2008). T_{H0} -Zellen erkennen diese über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR), bei gleichzeitiger Kostimulation über die Oberflächenmoleküle *cluster of differentiation 86* (CD86) (auf DC) und CD28 (auf T_{H0} -Zellen) und dem Vorhandensein von Interleukin-4 (IL-4) erfolgt die Aktivierung der T_{H0} -Zellen und ihre selektive Differenzierung zu T_{H2} -Zellen (Holgate 2008). Die aktivierten T_{H2} -Zellen beginnen mit der Sekretion ihrer Leitzytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und regen somit v.a. über IL-4 und IL-13 die Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen an. Die T_{H2} -Stimulation von B-Zellen bewirkt darüber hinaus den - für das allergische AB essentiellen - Isotyp-Klassenwechsel der Plasmazellen von IgM zu IgE und somit die Produktion von antigenspezifischen IgE-Antikörpern, welche von IgE-Rezeptoren (Fc ϵ RI) auf Mastzellen gebunden werden (Albert et al. 2012). Der Prozess der Sensibilisierung läuft symptomlos ab, erst nach erneutem Allergenkontakt wird die allergische Reaktion ausgelöst, bei der sich eine von Mastzellen dominierte Frühreaktion von der T-Zell-gesteuerten Spätreaktion unterscheiden lässt.

Frühreaktion

Der erneute Allergenkontakt führt über eine Quervernetzung der an die Fc ϵ RI gebundenen IgE-Moleküle zur Aktivierung von Mastzellen (Albert et al. 2012), woraufhin innerhalb weniger Sekunden eine Degranulation mit Ausschüttung von Histamin, Prostaglandin D₂ (PGD₂), Tryptase und Leukotrienen ausgelöst wird. Die Freisetzung dieser proinflammatorischen Mediatoren führt zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur und einer erhöhten Kapillarpermeabilität und somit zum Anschwellen der bronchialen Schleimhaut und einem Bronchospasmus (Holgate 2008).

Zusätzlich werden durch aktivierte Mastzellen Zytokine und Chemokine wie IL-4, IL-5 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) freigesetzt, welche die T-Zell-gesteuerte Spätreaktion einleiten.

Spätreaktion

Circa vier bis zehn Stunden nach der akuten Asthmaattacke wird das respiratorische Epithel von T_H2-Zellen, eosinophilen Granulozyten und Makrophagen infiltriert (Albert et al. 2012). T_H2-Zellen steuern und perpetuieren mit der Produktion ihrer Leitzytokine IL-4, IL-5 und IL-13 die lokale Entzündungsreaktion in den Atemwegen (Holgate und Polosa 2008). IL-4, zusammen mit IL-13, ist verantwortlich für die erhöhte Mukusproduktion des respiratorischen Epithels. IL-13 scheint darüber hinaus das Kernelement der Entwicklung der bronchialen Hyperreagibilität zu sein und bewirkt zusätzlich zu der Becherzellhyperplasie eine vermehrte Kontraktilität der glatten Bronchialmuskulatur und vermehrte Kollagenablagerungen in der Basalmembran. IL-5 ist das zentrale Zytokin, welches für die Eosinophilie bei Asthmapatienten verantwortlich gemacht wird, indem es die Reifung Eosinophiler Granulozyten im Knochenmark und deren Freisetzung in die Peripherie stimuliert (Holgate 2008). Eosinophile Granulozyten produzieren ihrerseits eine Vielzahl von proinflammatorischen und gewebebeschädlichen Mediatoren wie *major basic protein* (MBP), eosinophiles kationisches Protein (ECP), eosinophile Peroxidase und Sauerstoffradikale sowie IL-4, welches wiederum die T_H2-Zell-Stimulation verstärkt (Holgate 2008).

1.1.3 Therapie

In der Therapie von Patienten mit AB muss unterschieden werden zwischen der Akuttherapie während eines Anfalls und der Langzeittherapie, welche als Ziel die Kontrolle der Krankheitsaktivität und - sofern möglich - die Anfallsfreiheit anstrebt (Karow 2014).

Neben den altbekannten Therapeutika, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll, wurde 2005 als erstes und bisher einziges Biological der monoklonale IgE-Antikörper Omalizumab zur Therapie des schweren AB zugelassen (Karow 2014). Andere Biologicals, welche weitere typische Mediatoren der T_H2-gesteuerten Immunreaktion wie IL-5, IL-9 und IL-13 als Zielstrukturen haben, befinden sich noch in der klinischen Erprobung (Pelaia et al. 2012; Leckie et al. 2000). Die Wirkung dieser

neuen Therapeutika ist jedoch an das Vorhandensein eines T_H2 -high Subtyps geknüpft. Für andere, nicht T_H2 -Zell-dominante Asthmasubtypen bestehen weiterhin keine neuen Therapieoptionen (Fajt und Wenzel 2014). Die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten für AB hat sich in den letzten Jahren auf viele Forschungsfelder ausgedehnt. Einer dieser neuen Forschungsansätze betrifft die Familie der micro Ribonukleinsäuren (microRNA, miRNA oder miR) und ihren Einfluss auf allergische Erkrankungen.

1.2 microRNAs

MicroRNAs (im Folgenden miRNAs oder miRs) sind 19 bis 21 Nukleotide lange, nicht kodierende RNAs, die eine wichtige Rolle in der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression einer Zelle spielen. Der Effekt auf ihr Zielgen ist hochspezifisch, in den meisten Fällen inhibitorisch und wird über die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) einer messenger RNA (mRNA) vermittelt (Watson 2011).

Erste Hinweise für die Existenz von miRNAs wurden bereits in den neunziger Jahren gefunden, als das Transkript von lin-4 als nicht-kodierende RNA (ncRNA) im Wurm *C.elegans* identifiziert wurde. Lin-4 wies eine komplementäre Struktur zur 3'-UTR des Proteins lin-14 auf und schien dessen Expression herunter zu regulieren (Lee et al. 2004; Lee et al. 1993). Einige Zeit später wurde die zweite miRNA, let-7, entdeckt und in einer Vielzahl von weiteren Spezies identifiziert (Almeida et al. 2011). Heute gehört die let-7 Familie zu den am besten erforschten miRNAs im Menschen und miRNAs wurden in allen drei Domänen des Lebens identifiziert sowie als evolutionär hoch konserviert eingestuft (Bartel 2004; Ha und Kim 2014; Pillai 2005; Friedman et al. 2009; Bartel 2004). Seit der Entdeckung von lin-4 ist das Forschungsfeld enorm gewachsen und dank immer besserer Detektionsmethoden wächst die Anzahl bekannter miRNAs und ihrer potentiellen Zielgene weiterhin rasant, sodass die Datenbank miRbase (www.mirbase.org) in der letzten Aktualisierung von 2014 bereits 28645 Einträge für miRNAs verzeichnen konnte.

1.2.1 microRNA-Biogenese

miRNAs können in unterschiedlichen Bereichen des Genoms lokalisiert sein; sowohl innerhalb von Exons und Introns, als auch in nicht-kodierenden Regionen (Watson 2011). Einige miRNAs liegen auch in Form von Gen-Clustern in unmittelbarer Nähe voneinander im Genom vor, wobei ein Gen-Cluster bis zu acht miRNAs enthalten kann

(Altuvia et al. 2005). Die Genexpression einer miRNA ist gewebespezifisch und steht häufig in Zusammenhang mit räumlich nah gelegenen Genen und einer Vielzahl bisher kaum erforschter Faktoren. Häufig werden die miRNAs eines Gen-Clusters im Sinne einer Transkriptionseinheit kotranskribiert, auch wenn einzelne miRNAs eines Clusters wiederum weiteren post-transkriptionellen Regulationsmechanismen unterliegen können (Ha und Kim 2014; Bartel 2004).

Das Primärtranskript einer miRNA, die sogenannte *primary* microRNA (pri-miRNA), hat eine Länge von bis zu 3000 Nukleotiden und ist mit einem Poly-A-Schwanz und einem Guanosin-Cap versehen (Watson 2011). Die pri-miRNA wird im Zellkern durch den sog. *microprocessor complex* aus *droscha* (einer RNase) und der Untereinheit *pasha*, zur *precursor* microRNA (pre-miRNA) mit einer Länge von ca. 60 Nukleotiden prozessiert und lagert sich je nach Sequenz in ihrer charakteristischen Haarnadelstruktur zusammen. Nach dem Transport ins Zytosol wird die doppelsträngige (ds) pre-miRNA durch das Enzym *dicer* zur reifen, ca. 20 Nukleotid langen einzelsträngigen miRNA geschnitten. Die reife miRNA wird nun in einen Ribonukleinkomplex, den *RNA-induced silencing complex* (RISC), aufgenommen und kann in dieser Form durch die Interaktion mit der 3'-UTR von Ziel-mRNAs deren Translation beeinflussen. Hohe Komplementarität von miRNA und 3'-UTR führt hierbei zum Abbau der mRNA durch Spaltung, ein Mechanismus der sich v.a. bei Pflanzen finden lässt (Pasquinelli 2012b). Bei Tieren besteht im Großteil der Fälle nur eine partielle Komplementarität, welche durch Destabilisierung der mRNA über eine Deadenylierung und *decapping* zu einer Translationshemmung und verminderten Proteinexpression führt (Jens und Rajewsky 2015). Im Gegensatz zu den im Rahmen der RNA-Interferenz gefundenen *small interfering RNAs* (siRNA) besitzen miRNAs in Tieren jedoch fast nie vollständige Komplementarität und können auf diesem Wege eine Vielzahl von Zielgenen regulieren.

Die Region, welche essentiell für die Basenpaarung zwischen mRNA und miRNA ist, umfasst nur ca. 5-7 Nukleotide und befindet sich am Beginn des 5'-Endes der miRNA (Ha und Kim 2014). Sie wird als *Seed*-Sequenz bezeichnet und zeigt meist komplette Komplementarität zur Ziel-mRNA. Jedoch lässt sich über den Grad der Komplementarität keine eindeutige Vorhersage von möglichen Zielgenen erreichen, da weitere Faktoren, so wie z.B. der GC-Gehalt um die *Seed*-Sequenz, einen Einfluss auf die Stärke der Bindung von miRNA und mRNA zu haben scheinen (Wang 2014). Über 60 % der humanen, für Proteine kodierenden mRNAs enthalten laut Friedman et al.

mindestens eine konservierte miRNA-Bindungsstelle (2009). Eine genauere prozentuale Angabe von Genen, deren Expression tatsächlich relevant über miRNAs reguliert wird, fällt jedoch aufgrund der enormen Anzahl von potentiellen Interaktionspartnern und fehlender experimenteller Validierung weiterhin schwer. Angesichts dieses rasant wachsenden Forschungsfeldes wurden inzwischen eine Vielzahl von Internetangeboten, wie die bereits erwähnte Datenbank miRbase (<http://www.mirbase.org/> 2014), entwickelt, welche mit statistischen Vorhersagen für potentielle miRNA/mRNA-Interaktionen oder dem Sammeln bereits validierter miRNA-Zielgene mit Evidenzgrad hilfreiche Ergänzungen zur experimentellen Forschung bieten.

1.2.2 Die microRNA-Forschung in der klinischen Anwendung

Mit dem zunehmenden Wissen über miRNAs, ihre Funktionsweise und Einfluss auf die Genexpression eines Gewebes oder Zelltyps wächst auch das Verständnis über ihre Bedeutung in der Medizin. Inzwischen konnten bei einer Vielzahl von Erkrankungen pathologische Veränderungen der miRNA-Expression des betroffenen Gewebes festgestellt werden, beispielsweise bei kardiovaskulären und Atemwegserkrankungen sowie zahlreichen Krebserkrankungen (Esquela-Kerscher und Slack 2006, Maegdefessel 2014, 2014; Hayes et al. 2014; Young et al. 2013; Booton und Lindsay 2014). Mithilfe von miRNA Microarrays (miRNA-Arrays) können miRNA-Expressionsmuster von kranken und gesunden Individuen in verschiedenen Geweben verglichen werden. Diese Daten bieten die Möglichkeit, potentiell veränderte miRNA-Expressionsmuster unterschiedlicher Erkrankungen aufzudecken, sowie einzelne hoch- oder runterregulierte miRNAs und deren Zielgene zu identifizieren. Ein beliebter Ansatz für die Erforschung möglicher klinischer Anwendungen ist die Hemmung einzelner miRNAs über sogenannte Antagomirs, die eine spezifische miRNA durch Hybridisierung blockieren, und somit Einblick geben können über die physiologische Wirkung einzelner miRNAs in unterschiedlichen Geweben (Li et al. 2014).

Eine Herausforderung bei der Entwicklung von klinischen Anwendungen stellt u.a. das komplexe Gerüst der Interaktionen von miRNAs und mRNAs dar, welches sich meist nicht auf eine singuläre Paarung zwischen einer miRNA und mRNA reduzieren lässt. Trotz ihrer Komplexität steht die miRNA-Forschung zwanzig Jahre nach der Entdeckung von *lin-4* bereits kurz vor dem Einzug in die klinische Anwendung. Die Firma Santaris Pharma stellte kürzlich die Ergebnisse ihrer Studien mit dem

Medikament *Miravirsen* vor, dem ersten antisense-Nukleotid-Medikament (Janssen, Harry L A et al. 2013). *Miravirsen* wurde als Antagomir zur miRNA-122 entwickelt, welche bei mit Hepatitis C infizierten Patienten entscheidend an der Virusreplikation beteiligt ist (Gebert, Luca F R et al. 2014). Die Substanz konnte in einer Phase II Studie über fünf Wochen die Viruslast bei mit Hepatitis C infizierten Patienten signifikant senken.

Eine weitere klinische Anwendungsmöglichkeit für miRNAs, die momentan erforscht wird, ist der Nutzen von frei zirkulierenden miRNAs als Biomarker (Weiland et al. 2012). Es konnten unterschiedliche miRNAs in Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel und Urin identifiziert werden, welche sich als diagnostische Tumormarker eignen könnten. Hanke et al. (2010) konnten zeigen, dass das Verhältnis der miRNA-126 zur miRNA-152 im Urin mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils über 70% das Vorhandensein eines Harnblasenkarzinoms vorhersagte (2010). Auch für weitere Tumorentitäten wie das Plattenepithelkarzinom (Park et al. 2009) oder das kolorektale Karzinom (Huang et al. 2010) konnten miRNAs als potentielle Biomarker identifiziert werden.

1.3 Epigenetik des Asthma bronchiale: Neue Forschungsansätze

Warum Asthmapatienten auf Allergenkontakt in der Lunge eine T_H2 -dominierte Immunreaktion entwickeln, ist weiterhin nicht ausreichend geklärt. Fehlgesteuerte regulatorische T-Zellen (T_{reg} -Zellen) scheinen eine essentielle Rolle bei der mangelnden Kontrolle der T_H2 -Immunantwort zu spielen (Ray et al. 2010; Robinson 2009). Weitere Einflussfaktoren, die aktuell diskutiert werden, sind eine Stimulierung der T_H2 -Immunantwort durch Natürliche Killerzellen (NKT) (Choi et al. 2014) und das bronchiale Epithel (Lloyd und Hessel 2010).

Auch wenn in der Vergangenheit eine Vielzahl von Asthma-assoziierten Genen identifiziert werden konnte, welche eine Polarisierung der Immunantwort Richtung T_H2 -Dominanz bewirken (Ho 2010), so reichen diese Erkenntnisse nicht aus, die Entwicklung von AB vorherzusagen oder zu erklären. Auch der schnelle Anstieg der Prävalenz der Erkrankung und der starke Zusammenhang mit Umwelteinflüssen bestärken die Annahme, dass komplexe epigenetische Regulationsmechanismen einen entscheidenden Anteil an der Entstehung haben. Inzwischen konnte eine Vielzahl von epigenetischen Veränderungen in der Differenzierungsphase von T-Helferzellen

identifiziert werden, welche zu einer vermehrten Euchromatin-Konfiguration an spezifischen T_H2 -Genloci führen und somit die Entstehung und Konsolidierung der T_H2 -Immunantwort mitverantworten (Ho 2010). Beispiele hierfür sind Veränderungen der Histonacetylierung an Leitzytokinloci wie IL-4 und IFN- γ (Fields et al. 2002), vermehrte Demethylierung im Bereich des IL-4 Promotors (Lee et al. 2002) und eine vermehrte *de novo* Methylierung des IFN- γ Promotors (Jones und Chen 2006). Brand et al. konnten zudem zeigen, dass die Veränderungen des IFN- γ -Promotors im Asthma-Mausmodell nach Allergensensibilisierung auftreten und mit einem DNA-Methyltransferaseninhibitor mit positivem Effekt auf den Asthma Phänotyp aufgehoben werden konnten (2012).

Ein weiterer Bereich der posttranskriptionellen Regulation, der zurzeit verstärkt erforscht wird, ist der Einfluss von miRNAs auf die Pathogenese der Erkrankung. So wurde u.a. entdeckt, dass murine bronchiale Epithelzellen im Asthma-Mausmodell ebenso wie humane bronchiale Epithelzellen von Asthmapatienten unterschiedliche miRNA-Expressionsmuster im Vergleich zu gesunden Individuen aufweisen (Solberg et al. 2012; Liu et al. 2012; Garbacki et al. 2011; Jardim et al. 2012). Je nach Studie fanden sich bis zu 70 signifikant verändert exprimierte miRNAs. Auch die T_H2 -Polarisation scheint durch miRNAs reguliert zu werden (Rebane und Akdis 2014). Eine der bisher am besten untersuchten miRNAs in diesem Kontext ist die miRNA-21, sie reguliert den IL-12p35/IFN- γ Pfad und wird im murinen Modell der allergischen Atemwegsinflammation vermehrt exprimiert (Lu et al. 2009). miRNA-21-defiziente Mäuse zeigten nach Sensibilisierung mit Ovalbumin eine signifikant verringerte IL-4 und erhöhte IFN- γ Produktion der CD4⁺ Zellen und somit eine vermehrte Verschiebung in Richtung T_H1 -gesteuerte Immunabwehr (Lu et al. 2011).

Im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik der Universität Marburg, in dem auch die vorliegende Dissertation verfasst wurde, wurden ebenfalls Untersuchungen zu den miRNA-Expressionsmustern beim allergischen AB durch geführt. miRNA-Arrays von murinen *ex vivo* isolierten T_H1 - und T_H2 -Zellen der akut allergisch entzündeten Lunge zeigten distinkte Unterschiede in den miRNA-Expressionsprofilen der zwei Subtypen von T-Helferzellen (unveröffentlichte Daten). Ob und wie sich diese veränderte miRNA-Expression auf die Pathogenese des allergischen AB auswirkt, ist dabei bisher noch weitgehend ungeklärt.

1.4 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis des Einflusses von miRNAs auf die Pathogenese des allergischen AB leisten. Zu diesem Zweck wurden auf Basis der in derselben Arbeitsgruppe durchgeführten miRNA-Arrays von murinen T_H1- und T_H2-Zellen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge die gefundenen miRNA-Expressionsunterschiede in den zwei Subtypen von T-Helferzellen näher untersucht.

Hierfür wurde speziell die miRNA-15b mit einer zweifachen Erhöhung der relativen Expression in T_H2- zu T_H1-Zellen ausgewählt. Da miRNAs vornehmlich inhibitorische Funktionen auf die Expression ihrer Zielgene ausüben, wurde im Datensatz der gleichzeitig erhobenen mRNA-Profile nach herunterregulierten, immunologisch relevanten mRNAs gesucht. Hierbei zeigte IFN- γ als linienspezifisches Zytokin von T_H1-Zellen eine niedrigere Expression in der Population der T_H2 Zellen. Eine datenbankgestützte Zielgenanalyse konnte IFN- γ als potentielles Zielgen der miRNA-15b bestätigen, sodass IFN- γ für die Untersuchung der Effektorfunktion der miRNA-15b ausgewählt wurde.

Es sollte somit untersucht werden, ob die miRNA-15b die Genexpression von IFN- γ in T_H2-Zellen beeinflusst und auf diese Weise an der Konsolidierung des T_H2-dominanten Phänotyps des allergischen AB beteiligt sein könnte. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich die im Vorfeld gefundenen Expressionsunterschiede der miRNA-15b auch *in vitro* und bereits während der Differenzierungsphase von T_H1- und T_H2-Zellen finden lassen.

Zusammengefasst betrachtet die vorliegende Arbeit die folgenden Aspekte:

- Die experimentelle Validierung von IFN- γ als vorhergesagtes Zielgen der miRNA-15b
- Die Bestimmung der Expressionslevel der miRNA-15b *in vitro* während und nach Abschluss der Differenzierungsphase von T_H1- und T_H2-Zellen
- Die Transfektion von *in vitro* differenzierten murinen T-Helferzellen mit miRNA-15b und anti-miRNA-15b
- Die Transfektion von *ex vivo* gewonnenen murinen T-Helferzellen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge mit miRNA-15b und anti-miRNA-15b

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
EasySeal™ Abdeckfolie	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Nunc-Immuno™ 96 well microplate	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
Petrischalen 60*15mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Biosphere® Filter Tips RNase frei Serological Pipettes Serological Pipettes	Eppendorf AG, Hamburg, DE Sarstedt, Nümbrecht, DE Sarstedt, Nümbrecht, DE Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
PS Röhrrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße 0,5ml Nuclease frei 1,5ml Nuclease frei 1,5ml Reaktionsgefäß 15ml Zentrifugenröhrchen 50ml Zentrifugenröhrchen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Säulen (Zellisolation) MS column LS column	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
Spritzen 1ml BD Plastipak™	BD Bioscience, Franklin-Lakes, USA
Transferpipette	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturflaschen T25 T75	Sarstedt, Nümbrecht, DE Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zellsieb	BD, Franklin-Lakes, USA

2.1.2 Zelllinien

Für die Versuche der vorliegenden Dissertation kamen HEK293 (Human Embryonic Kidney)-Zellen zum Einsatz. Die Zellen wurden in inaktiviertem fetalem Kälberserum mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.1.3 Versuchstiere

In der vorliegenden Dissertation wurden weibliche Balb/c Mäuse in einem Alter von 6-8 Wochen eingesetzt.

2.1.4 Kits

Produktname	Firma
CD4+ CD62L+ T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
DNase I Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Madison, USA
DuoSet® ELISA Mouse IFN- γ	R&D Systems, Minneapolis, USA
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
Omniscript Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit	Lonza, Basel, CH
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
TaqMan® microRNA RT Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.1.5 Antikörper, Fluorochrome und Interleukine

Produktname	Firma
DAPI	eBioscience, San Diego USA
rmIL-12 recombinant murine IL-12	Peprotech, Rocky Hill, USA
rmIL-2 recombinant murine IL-2	Peprotech, Rocky Hill, USA
rmIL-4 recombinant murine IL-4	Peprotech, Rocky Hill, USA
α CD16/CD32 Mouse BD FC-Block™ rat anti-mouse CD16/CD32	BD Bioscience, Franklin-Lakes, USA
α CD28 NA/LE hamster anti-mouse CD28	BD Bioscience, Franklin-Lakes, USA
α CD3 Leaf™ anti-mouse CD3	BioLegend, San Diego, USA
α IFN- γ Leaf™ anti-mouse IFN- γ	BioLegend, San Diego, USA
α IL-12 Leaf™ anti-mouse IL-12	BioLegend, San Diego, USA
α IL-4 Leaf™ anti-mouse IL-4	BioLegend, San Diego, USA

2.1.6 microRNAs, Antagomirs und Primer

2.1.6.1 microRNAs und Antagomirs

Produktname und Sequenz	Firma
syn-mmu-miR-15b-5p miScript miRNA Mimic 5'UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
syn-mmu-miR-29a-3p miScript miRNA Mimic 5'UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
anti-mmu-miR-15b-5p miScript miRNA Inhibitor 5'UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
anti-mmu-miR-29a miScript miRNA Inhibitor 5'UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
hsa-miR-15b-5p <i>miRvana</i> TM miRNA Mimic 5'UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	Life Technologies, Carlsbad, USA
Negative Control #1 <i>miRvana</i> TM miRNA Mimic	Life Technologies, Carlsbad, USA
siAF488	Schenkung der AG Prof.Dr.Kissel, FB Pharmazie, Philipps-Universität Marburg

2.1.6.2 Primer microRNAs

Produktname und Sequenz	Firma
Megaplex TM RT Primer Pool Rodent Pool A	Life Technologies, Carlsbad, USA
hsa-miR-15b-5p Primer 20X Taqman MicroRNA Assays	Life Technologies, Carlsbad, USA
sno-RNA202 Primer20X Taqman Control miRNA Assay	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.1.6.3 Primer messenger RNAs

Gen	Sequenz	Firma
mIFN- γ for	5'GCT TTG CAG CTC TTC CTC AT3'	Metabion, Martinsried, DE
mIFN- γ rev	5'GCA GGA TTT TCA TGT CAC CA3'	Metabion, Martinsried, DE

mIL-5 for	5'AAT GAG ACG ATG AGG CTT CC3'	Metabion, Martinsried, DE
mIL-5 rev	5'GTC TCT CCT CGC CAC ACT TC3'	Metabion, Martinsried, DE
mIL-13 for	5'GGA GCT GAG CAA CAT CAC AC3'	Metabion, Martinsried, DE
mIL-13 rev	5'GTG GGC TAC TTC GAT TTT GG3'	Metabion, Martinsried, DE
mL32 for	5'GCA AGT TCC TGG TCC ACA AT3'	Metabion, Martinsried, DE
mL32 rev	5'GGG ATT GGT GAC TCT GAT GG3'	Metabion, Martinsried, DE

2.1.7 Plasmide

Name	Firma
pmirGLO	Promega, Madison, USA
pmaxGFP®	Lonza, Basel, CH

2.1.8 Chemikalien und Reagenzien

Name	Firma
2 N H ₂ SO ₄	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Agarose	Peqlab, Erlangen, DE
BM Blue POD Substrate	Roche, Mannheim, DE
BSA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
CD4 mouse MicroBeads L3T4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
DNA loading dye	Fermentas Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
DNA-Leiter Gene Ruler 50bp	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
EDTA	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE Otto Fischar, Saarbrücken, DE
Ethidiumbromid	Appllichem GmbH, Darmstadt, DE
FuGene® Transfection Reagent	Promega, Madison, USA
Glykogen	Peqlab, Erlangen, DE
HiPerFect Transfection Reagent	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
Isopropanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
Restriktionsenzyme Xba I Xho I	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
RNA-Leiter HighRange	Peqlab, Erlangen, DE
RNase freies Wasser	Peqlab, Erlangen, DE QIAGEN GmbH, Hilden, DE Life Technologies, Carlsbad, USA

siPORT™ Transfection Agent	Life Technologies, Carlsbad, USA
SybrGreen	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Life Technologie, Carlsbad, USA
TriFast™	Peqlab, Erlangen, DE
Trypsin EDTA (1X)	PAA, Pasching, AT
Tween® 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

2.1.9 Medien und Puffer

Name und Zusammensetzung	Firma
<i>Differenzierungsmedium T-Zellen</i> RPMI 1640 10% Fetales Kälberserum 1% L-Glutamin 1% NEAA 1% Penicillin / Streptomycin 50µM β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE PAA, Pasching, AT PAA, Pasching, AT PAA, Pasching, AT Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
<i>DPBS</i> (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
<i>ELISA Blockpuffer</i> 1% BSA in PBS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
<i>ELISA Probenpuffer</i> 0,1% BSA 0,05% Tween 20 in PBS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
<i>ELISA Waschpuffer</i> 0,05% Tween 20 in PBS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
<i>HEK293 Vollmedium</i> Dulbecco's MEM w/ Glutamin 10% Fetales Kälberserum 1% Penicillin / Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, DE Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE PAA, Pasching, AT
<i>LB Medium</i> VE Wasser Trypton / Pepton Hefe NaCl 100 µg/ml Medium Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
<i>MACS-Puffer</i> DPBS 0,5% Fetales Kälberserum 2mM EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE Life Technologies™, Carlsbad, USA
Medien Durchflusszytometer FACS Flow FACS Clean FACS Shutdown	BD Bioscience, New Jersey, USA
Tris-Acetat-EDTA Puffer 1X	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

2.2 Geräte und Software

2.2.1 Geräte

Gerät	Firma
4-D Nucleofector™	Lonza, Basel, CH
Brutschrank Hera Cell 240i	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Elektrophoresekammer	Peqlab, Erlangen, DE
FACS Canto II Durchflusszytometer	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Fusion FX17	Peqlab, Erlangen, DE
Kühl- und Gefrierschränke 4°C Liebherr Medline -20°C Liebherr Premium -80°C HeraFreeze	Liebherr-International AG, Biberach an der Riss, DE Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
MACS Separator MidiMACS MiniMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach, DE
Mikroskop BH-2	Olympus, Hamburg, DE
Mikrowelle	LG, Mississauga, USA
MJ Mini™ Personal Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Nunc-Immuno™ Wash 12	Thermo-Scientific Inc., Waltham, USA
Pipetten Pipettus®-akku Eppendorf Reference	Hirschmann Laborgeräte, Herrenberg, DE Eppendorf, Hamburg, DE
Reax Top Vortex	Heidolph, Kehlheim, DE
Reinraumwerkbank HeraSafe MSC Advantage	Heraeus, Hanau, DE Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Rotorgene RG-3000	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
Tecan Reader Infinite 200 Pro	Tecan Group AG, Maennig, CH
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, DE
Waage	Sartorius, Göttingen, DE
Wasserbad	GFL, Burgwedel, DE
Zellzähler Casy TT CasyTon CasyClean	Schärfe System, Reutlingen, DE Roche, Mannheim, DE Roche, Mannheim, DE
Zentrifugen Megafuge 1.0 R Biofuge pico Millifuge Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau, DE Heraeus, Hanau, DE Millipore, Billerica, USA
LUMIstar Lumimometer	BMG Labtech, Ortenberg, DE

2.2.2 Software

Name	Firma
Citavi 4	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz

FACS Diva 6.1.3	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
GraphPad Prism Version 4.01 und 5.01	GraphPad Software, San Diego, USA
Office 2007	Microsoft, Redmond, USA
Rotor Gene 6.1	Corbett, NSW, AUS
Magellan 7.2	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH

2.2.3 Datenbanken

<i>miRbase</i>	(http://www.mirbase.org/ 2014; Kozomara und Griffiths-Jones 2011, 2014)
<i>miRecords</i>	(http://mirecords.biolead.org/ 2014; Xiao et al. 2009)

Die Datenbank *miRecords* greift wiederum auf die folgenden Suchalgorithmen zu:

<i>DIANA-microT</i>	(http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/ (2014); Maragkakis et al. 2009)
<i>MicroInspector</i>	(http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/ 2010)
<i>miRanda</i>	(http://www.microrna.org/microrna/home.do 2014; Betel et al. 2008)
<i>miRTarget2</i>	(http://mirdb.org/miRDB/ 2015; Wong und Wang 2015)
<i>miTarget</i>	(http://cbit.snu.ac.kr/~miTarget/ 2014; (Kim et al. 2006)
<i>NBmiRTar</i>	(http://wotan.wistar.upenn.edu/NBmiRTar/ 2014)
<i>PicTar</i>	(http://pictar.mdc-berlin.de/ 2012)
<i>PITA</i>	(http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_dyn_data.html 2014)
<i>RNAhybrid</i>	(http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/ (2014); Rehmsmeier et al. 2004)
<i>TargetScan/TargetScanS</i>	(http://www.targetscan.org/ 2014; Friedman et al. 2009; Lewis et al. 2005)
<i>RNA22</i>	(https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/ 2014; Miranda et al. 2006)

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkultur

Für den Reporter-genassay kamen HEK293-Zellen (Human Embryonic Kidney Cells) zum Einsatz. Diese Zelllinie ist im Bereich der Molekularbiologie gut etabliert und zeichnet sich durch ein adhärentes Wachstum und einfache Handhabung und Transfizierbarkeit aus.

2.3.1.1 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden initial nach dem Auftauen in T25 Flaschen mit Dulbecco's MEM Medium bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Erreichen von ca. 70%iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert und in neue Zellkulturflaschen überführt. Hierfür wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1x Trypsin EDTA (0,05% / 0,02%) vom Boden der Flasche gelöst. Die resuspendierten Zellen wurden für fünf Minuten bei 1300 rpm in einem 15 ml Falcon zentrifugiert und anschließend in neuem Medium gelöst.

Ab der fünften Passage wurden die Zellen in T75 Flaschen wachsen gelassen und für Versuche verwendet. Insgesamt wurden die Zellen bis zur 25. Passage verwendet.

2.3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem Casy® Cell Counter mittels Stromausschlussverfahren. So konnte neben der Zellzahl auch die Zellvitalität beurteilt werden.

2.3.2 Transfektion der HEK293 Zellen

Für die Transfektionsversuche wurde ein Teil der kultivierten Zellen beim Passagieren in 48 *well* Platten (wp) umgesetzt und in Dulbecco's MEM Medium bei 37° C für 24 h inkubiert. Die initiale Zellzahl lag bei ca. $5 \cdot 10^4$ Zellen/*well* in jeweils 500 µl Medium. Vor Beginn des Versuches wurde mikroskopisch überprüft, ob die Zellen adhärent am Boden der *wells* saßen. Die Transfektion von Plasmid und microRNAs bzw. Antagomirs erfolgte zeitgleich.

2.3.2.1 Transfektion des IFN- γ 3'-UTR Plasmids

Die Transfektion des Plasmids erfolgte mit dem Reagenz FuGene® der Firma Promega. Hierfür wurde 0,75 μ l Transfektionsreagenz je 0,5 μ g Plasmid verwendet. Die transfizierte Menge des Plasmids lag bei 0,5 μ g pro well. Entsprechend der Anzahl der zu transfizierenden wells wurde ein Mastermix aus Plasmid, Transfektionsreagenz und Medium erstellt, kurz mithilfe des Vortex gemischt und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 μ l Mastermix pro well vorsichtig auf die Zellen gegeben.

2.3.2.2 Transfektion der microRNAs und Antagomirs

Für die Transfektion der miRNAs und Antagomirs wurde das Reagenz HiPerFect der Firma Qiagen verwendet. Die Transfektion erfolgte dabei nach folgendem Ansatz in jeweils 50 μ l DMEM ohne Zusätze pro well.

Tabelle 1: Transfektionsansätze HiPerFect

microRNA /Antagomir	HiPerFect/well (48 wp)
1 nM, 5 nM	1,5 μ l
10 nM, 20 nM	3 μ l
50 nM, 100 nM, 200 nM	6 μ l

Auch hier wurde zunächst ein Mastermix in der entsprechenden Menge angesetzt, kurz mithilfe des Vortex gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor dieser tröpfchenweise auf die Zellen verteilt wurde.

2.3.3 Dual-Luciferase® Reporter Assay

2.3.3.1 Prinzip

Mithilfe von Reporterenzymassays ist es möglich, Informationen über potentielle Zielgene von miRNAs zu erhalten und miRNA/mRNA-Interaktionen zu untersuchen. Für diesen Zweck werden modifizierbare Plasmide mit Reporter- und Kontrollenzymen verwendet. In diesem Versuch wurde das Plasmid pmirGLO (Promega) verwendet, welches zwei Luciferasen, eine KontrollLuciferase (Renilla-Luciferase) und eine ReporterLuciferase (Firefly-Luciferase) mit einer *multiple cloning site* am 3'-Ende, enthält. In die *multiple cloning site* des Reporterenzym kann das zu untersuchende

target, in diesem Falle der 3'-UTR von IFN- γ , eingefügt und das modifizierte Plasmid zusammen mit der zu untersuchenden miRNA transfiziert werden. Kommt es in diesem System zu einer Bindung der miRNA an die eingefügte 3'-UTR, wird die Proteinexpression des Reporterenzym und somit dessen messbare Enzymaktivität gehemmt, während die Expression des Kontrollenzym und seine Enzymaktivität unverändert bleiben. Die miRNA/mRNA-Interaktion kann somit indirekt über den Parameter der Enzymaktivität bestätigt werden.

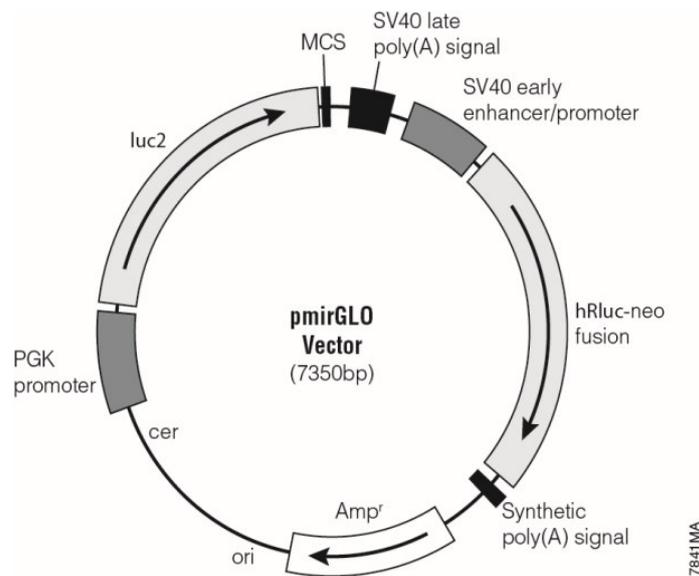


Abbildung 1: Aufbau des pmirGLO Plasmids

Mit freundlicher Genehmigung der Promega Corp./Courtesy of Promega Corp.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität, in diesem Fall die erzeugte Biolumineszenz der Luciferasen nach Substratzugabe, wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System (DLR™ Assay, Promega) verwendet. Luciferasen können ihre Substrate, sogenannte Luziferine, exogen oxidieren; die aus dieser Reaktion freiwerdende Energie wird in Form von Licht abgegeben und ist als Lumineszenz mit einem Photometer messbar. Die Enzymaktivitäten der zwei Luciferasen können durch ihre Substratspezifität getrennt voneinander gemessen werden. Die Firefly-Luciferase oxidiert Käferluziferin zu Oxyluziferin + AMP + PPi + CO₂ und Licht. Das Substrat der Renilla-Luciferase, Coelenterazin, wird von ihr zu Coelenteramid + CO₂ und Licht umgesetzt. Nachdem mit der Zugabe des Luciferase-Aktivierungsreagenz (LARII®) die

erste Reaktion gestartet wird, wird diese mit der Zugabe des Stop & Glo®-Reagenzes gestoppt und simultan die zweite Reaktion gestartet.

2.3.3.2 Durchführung

Das IFN- γ 3'-UTR Reporterplasmid wurde zusammen mit unterschiedlichen Mengen der miRNA-15b in HEK293-Zellen transfiziert. Nach jeweils 24 h und 48 h wurden die Zellen abgenommen, für mindestens eine Stunde bei -20° eingefroren und mithilfe des im Kit enthaltenen Lysepuffers lysiert.

Die Messung der Lumineszenz erfolgte mit dem LUMIstar Lumimometer der Firma BMG und mit dem Tecan Reader Infinite 200.

2.3.3.3 IFN- γ 3'-UTR Plasmid

In die *multiple cloning site* von pmirGLO war im Rahmen der als Ausgangspunkt für die vorliegende Dissertation dienenden Vorarbeiten von Dr. med. Matthias Schiller (ehemals AG Herr Prof. Renz) nach Herstellerprotokoll die 3'-UTR von IFN- γ eingefügt worden. Die Sequenzierung des Plasmids erfolgte durch die Firma SeqLab in Göttingen. Für die Verwendung des Plasmids für die Reporterenzymassays wurde der aufgereinigte Klon erneut mit kompetenten *E.colis* und 3 ml LB Medium über Nacht im Rotationsschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde 1 ml der Flüssigkultur abgenommen und das in den Bakterien vervielfältigte Plasmid mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert. Zur Kontrolle des eingebauten Segments erfolgte ein Restriktionsverdau mit XbaI und XhoI für 1 h bei 37°C im Heizblock. Das verdaute Plasmid wurde mit Ladepuffer auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und nach einer Laufzeit von 1,5 h bei 120 V ausgewertet.

Die restliche Flüssigkultur wurde nach dieser Kontrolle in 250 ml LB Medium gegeben und erneut für 24 h inkubiert. Die Plasmidisolierung im großen Maßstab erfolgte mit dem HiSpeed Maxi Kit von Qiagen. Die Konzentration des eluierten Plasmids wurde per Absorption mittels NanoDrop gemessen.

2.3.4 Mutation des IFN- γ 3'-UTR Plasmids

Zur genaueren Untersuchung der Bindung der miRNA-15b an IFN- γ wurden fünf Nukleotidbasen im Bereich der vorhergesagten Bindungsstelle zur *Seed*-Sequenz in der

3'-UTR im Reporterplasmid mutiert. Hierfür wurde das Multi Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies verwendet. Die Mutation wurde von Dr. rer. physiol. Ayşe Kiliç durchgeführt, die Sequenzierung erfolgte auch in diesem Fall durch die Firma SeqLab in Göttingen.

2.3.5 Versuchstiere und Tierversuchsprotokolle

2.3.5.1 Versuchstiere

Für die Tierversuche und Zellisolation wurden weibliche BALB/c Mäuse im Alter von 6-8 Wochen verwendet.

Die verwendeten Versuchstiere wurden im Tierstall des Biomedizinischen Forschungszentrum Marburg gehalten. Die Mäuse waren dort unter standardisierten Bedingungen mit vier bis fünf Individuen pro Käfig untergebracht. Die Durchführung der Versuche und Probengewinnung geschah streng nach Vorgaben der Tierversuchsgenehmigung „V 54-19 c 2015 h01 MR 20/13 Nr. 9/2013“ unter der Aufsicht von Dr. rer. physiol. Ayşe Kiliç.

Milzen von nicht sensibilisierten Mäusen wurden zur Isolation naiver T-Helferzellen genutzt. Aus den Lymphknoten von Balb/c Mäusen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge wurden differenzierte CD4+ Zellen gewonnen.

2.3.5.2 Zellisolation (Milz)

Die zuvor präparierte Milz wurde mit einer Transferpipette in ein Zellsieb übertragen und mithilfe eines Spritzenstempels vorsichtig durch das Sieb gedrückt. Die Zellsuspension wurde in einer Petrischale aufgefangen und mit MACS-Puffer verdünnt in ein 15ml Falcon pipettiert und bei 1300 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, wobei nach der Zentrifugation der Überstand verworfen und das Zellpellet vorsichtig resuspendiert wurde. Dabei wurden Überreste von Bindegewebe mit einer Transferpipette entfernt. Es folgte eine Lyse der Erythrozyten mit destilliertem Wasser, die Reaktion wurde nach wenigen Sekunden mit PBS gestoppt. Nach zwei weiteren Waschschrritten in PBS wurde das gelöste Pellet in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl mittels Casy Zellzähler bestimmt. Es folgte die in *Kapitel 2.3.6* beschriebene Isolation naiver T-Helferzellen.

2.3.5.3 Zellisolation (Lymphknoten)

Die präparierten Lymphknoten wurden ebenfalls mithilfe eines Zellsiebs und Spritzenstempels homogenisiert und mit einer Transferpipette in MACS-Puffer aufgenommen. Nach zwei Waschschritten mit MACS-Puffer wurde je nach Erythrozytengehalt des Zellpools eine Erythrozytenlyse mit destilliertem Wasser durchgeführt und anschließend die Zellzahl bestimmt. Es folgte ein Fc-Block mit α CD16/CD32 Antikörpern ($0,5 \mu\text{g} / 1 \times 10^6$ Zellen) und die in *Kapitel 2.3.6* beschriebene Isolation von T-Helferzellen.

2.3.6 Isolation von CD4+ Zellen mittels MicroBeads

2.3.6.1 Isolation naiver T-Helferzellen

Zur Isolation der naiven T-Helferzellen aus Milzen von nicht sensibilisierten Versuchstieren wurde das CD4+ CD62L+ T Cell Isolation Kit II der Firma Miltenyi verwendet. Dieses Kit benutzt das Prinzip der magnetischen Separation, indem bestimmte Zellgruppen mit kleinen Metallteilchen (MicroBeads) markiert und anschließend durch ein Magnetfeld positiv oder negativ selektioniert werden.

Zunächst wurden mit einer Negativselektion CD4- negative Zellen aussortiert. Auf die Zellsuspension wurde ein Antikörper-Cocktail, bestehend aus Biotin-konjugierten anti-mouse Antikörpern gegen CD4- Zellen (gegen CD8a, CD45R, CD11b, CD25, CD49b, TCR γ / δ und TER-119), sowie Anti-Biotin MicroBeads gegeben. Für den Selektionsprozess wurden die markierten Zellen in eine magnetische Säule pipettiert. Die mit MicroBeads markierten Zellen blieben in der Säule hängen, unmarkierte Zellen wurden nicht in der Säule magnetisch festgehalten und konnten diese passieren, der Durchfluss war die Fraktion der CD4+ Zellen. Anschließend folgte die Positivselektion der naiven T-Zellen durch eine Markierung mit CD62L MicroBeads und die erneute Passage durch eine magnetische Säule.

2.3.6.2 Isolation von T-Helferzellen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge

Die Isolation CD4+ Zellen erfolgte aus Zellsuspensionen der hilusnahen Lymphknoten von Balb/c Mäusen mit Asthma Phänotyp (akut). Hierfür wurden CD4 MicroBeads

(L3T4) der Firma Miltenyi verwendet und die Zellen mithilfe des oben beschriebenen Prinzips der magnetischen Separation nach Herstellervorgaben gewonnen. Die isolierte Zellsuspension enthält T-Helferzellen unterschiedlicher Subtypen, die zwischen Lunge und Lymphknoten zirkulieren.

2.3.7 *In vitro* Differenzierung naiver T-Helferzellen

Für die Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu T_H1- und T_H2-Zellen wurden die CD4⁺ CD62L⁺ selektierten Zellen in mit α CD3 beschichteten 48 wp ausgesät. Jedes *well* enthielt dabei ca. $3\text{-}5 \cdot 10^5$ Zellen in 500 μ l Differenzierungsmedium (Zusammensetzung siehe *Kapitel 2.1.9*).

Die Differenzierung der T-Helferzellen erfolgte über sechs Tage bei 37°C im Brutschrank mit den in *Tabelle 2* enthaltenen Stimulanzen. An Tag 3 wurden die Zellen abgenommen, zentrifugiert, in neuem Medium mit frischen Stimulanzen aufgenommen und je nach Wachstumsprogress auf mehrere *wells* gesplittet und zusätzlich mit rmIL-2 restimuliert.

An Tag 6 erfolgte dann die Durchführung der Transfektionsversuche oder die direkte Abnahme der Zellen zur RNA-Isolation.

Tabelle 2: Stimulanzen zur *in vitro* Differenzierung von naiven T-Helferzellen

Stimulanz	T _H 0	T _H 1	T _H 2
α CD3	10 μ g/ml	10 μ g/ml	10 μ g/ml
α IL-4		10 μ g/ml	
α IFN- γ			10 μ g/ml
α IL-12			10 μ g/ml
α CD28	1 μ g/ml	1 μ g/ml	1 μ g/ml
rmIL-12		10 ng/ml	
rmIL-4			20 ng/ml
rmIL-2 (nur zur Restimulation)	5 ng/ml	5 ng/ml	5 ng/ml

Vor Beginn der Versuche wurde das verwendete Protokoll mittels Darstellung der Expression der Leitzytokine IFN- γ , IL-13 und IL-5 in der Real-Time PCR überprüft.

2.3.8 Transfektion muriner T-Helferzellen

2.3.8.1 Transfektionsoptimierung

Zu Beginn der Transfektionsversuche wurde die Transfektionseffizienz von drei unterschiedlichen Methoden getestet. Die beiden Transfektionsreagenzien HiPerFect und siPORT™ sowie der Amaxa™ 4D-Nucleofector™ der Firma Lonza wurden jeweils miteinander verglichen. Die verwendeten Transfektionsreagenzien funktionieren beide nach dem Prinzip der Lipofektion, dem Transport von siRNA nach intrazellulär mittels liposomalen Vehikeln. Die Nucleofektion hingegen ist eine Weiterentwicklung der Elektroporationstechnik, welche durch ein elektrisches Feld die Permeabilität der Zellmembranen erhöht und somit eine Passage von extrazellulärem Material ermöglicht. Nucleofector™ und Nucleofection™ sind Markenzeichen der Firma Lonza, Köln.

Die Transfektionsoptimierung erfolgte mit *in vitro* differenzierten T_H1-Zellen (Protokoll *Kapitel 2.3.7*) nach abgeschlossener Differenzierung, als Kontrolle dienten untransfizierte T-Helferzellen derselben Differenzierung.

Die Transfektionseffizienz wurde durch die Transfektion einer fluoreszenzmarkierten siRNA (siAF488) überprüft. Die markierte siRNA wurde in einer Konzentration von 200 nM transfiziert und die Anzahl der AF488 positiven Zellen nach einer Ruhezeit von 4 h durchflusszytometrisch bestimmt. Die Anzahl der AF488 positiven Zellen wurde als Annäherung für die transfizierbaren Zellen gewertet und die Ergebnisse der drei Methoden verglichen. Für die Nucleofektionsversuche wurde zudem, wie vom Hersteller empfohlen, zur Kontrolle der Transfektionseffizienz das Plasmid pmaxGFP® transfiziert, welches für das grün-fluoreszierende Protein maxGFP™ kodiert.

Die Transfektion mit siPORT™ und HiPerFect erfolgte in 96 wp mit ca. $4\text{-}5 \cdot 10^4$ Zellen. Dabei wurde jeweils nach Herstellerangaben ein Mastermix aus Transfektionsreagenz, 200 nM siRNA und RPMI Medium ohne Zusätze mit einem Gesamtvolumen von 50 µl pro *well* angesetzt, für ca. 10 Minuten inkubiert und anschließend auf die Zellen pipettiert.

Für die Transfektion mit dem 4D-Nucleofector™ wurde das Herstellerprotokoll für primäre, murine T-Zellen (Balb/c) angewandt. Die Reagenzien für die Nucleofektion entstammten dem Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit. Die Zellen wurden für die

Transfektion in 100 μ l Nucleocuvetten in einem Mastermix aus Nucleofector™ Solution, Supplement und 200 nM siRNA oder 2,5 μ g pmaxGFP™ transfiziert und anschließend für max. 4 h in frischem T-Zell Medium inkubiert.

2.3.8.2 Transfektion muriner T-Helferzellen mit microRNA-15b und anti-microRNA-15b

Nach der Isolierung von naiven T-Helferzellen aus murinen Milzen, wurden diese zunächst zu reifen T_H1- und T_H2-Zellen differenziert (*Kapitel 2.3.7*). Nach erfolgter Differenzierung über sechs Tage wurden die Zellen an Tag 6 oder Tag 7 in ihren *wells* transfiziert. Die Abnahme der Zellen erfolgte nach weiteren 24 h.

Die aus den Lymphknoten gewonnenen CD4+ Zellen wurden für die Transfektionsversuche in mit α CD3 beschichteten 48 wp ausgesät. Die initiale Konzentration lag bei $4\text{-}5 \cdot 10^5$ Zellen in 500 μ l Medium. Dem Medium wurden zusätzlich α CD28 und IL-2 zur Restimulation der Zellen zugesetzt. Nach 24 h Ruhezeit wurden die Zellen mit den miRNA Mimics oder Antagomirs transfiziert. Die Zellen wurden ebenfalls nach einer Inkubationszeit von 24 h abgenommen.

Die Transfektion der murinen T-Helferzellen erfolgte in 48 wp mit einem Mastermix aus 6 μ l HiPerFect, 100 nM miRNA-15b oder 200 nM anti-miRNA-15b in 50 μ l RPMI Medium pro *well*.

Zur zusätzlichen Kontrolle des Transfektionserfolges wurde bei jeder Transfektion die relative Expression der transfizierten miRNA in den transfizierten und nichttransfizierten Zellen mittels Real-Time PCR-Analyse verglichen. Zeigten die behandelten Zellen höhere Spiegel an miRNA als die Kontrollzellen, so wurde von einer gelungenen Transfektion ausgegangen.

2.3.9 RNA Isolierung

Die RNA für die Real-Time PCR Versuche wurde mit der Phenol/Guanidinisothiocyanat-Methode nach Chomczynski und Sacchi aufgereinigt (Chomczynski und Sacchi 1987). Hierfür wurde das Reagenz TriFast™ der Firma Qiagen verwendet. Alle Arbeiten fanden unter RNase-freien Bedingungen statt. Pipettiert wurde ausschließlich mit Filterspitzen, die RNA nach dem Aufreinigen bei -80° C gelagert.

Die Zellsuspension wurde zunächst in 1 ml TriFast™ aufgenommen, eine Minute sanft mithilfe des Vortex gemischt und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Proben zu homogenisieren. Es folgte eine dreimalige Fällung der RNA mittels Zugabe von Chloroform, Zentrifugieren der Probe und Abnahme der wässrigen Phase. Die Interphase und Phenol/Chloroformphase mit DNA und Proteinen wurde verworfen.

Die RNA-Präzipitation erfolgte mit 100%igem Ethanol und Glykogen, bei niedrigen Probenvolumen wurde dieser Schritt bei -20°C über Nacht durchgeführt um eine bessere Ausbeute der Proben zu gewährleisten.

Anschließend wurde das RNA-Pellet drei Mal mit 75%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Nach dem Waschen wurde das Pellet für ca. zehn Minuten unter dem Abzug getrocknet und anschließend in RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

2.3.9.1 Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung diente eine Absorptionsmessung der eluierten Proben mittels NanoDrop Spectrophotometer. Hierbei konnte zugleich über die Ermittlung der $A_{260/280}$ - und $A_{260/230}$ -Ratios eine Aussage über die Qualität und Reinheit der extrahierten RNA getroffen werden. Es wurde eine $A_{260/280}$ -Ratio zwischen 1,8 und 2,1 und eine $A_{260/230}$ -Ratio über 2,0 angestrebt.

2.3.9.2 Überprüfen der Integrität

Im Anschluss erfolgte die Kontrolle der Integrität der aufgereinigten Proben, indem ca. 500 ng RNA auf ein 2%iges Agarosegel bei einer Laufzeit von 1,5 h mit 50 mV aufgetragen wurden. Die Banden der 18S (1,9 kb) und 28S (4,7 kb) rRNA-Untereinheiten wurden mithilfe einer HighRange-RNA-Leiter identifiziert.

2.3.10 Synthese komplementärer DNA

Die gewonnene RNA wurde zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, um diese im weiteren Verlauf für die quantitative PCR (Real-Time PCR) nutzen zu können. Je nach vorliegender RNA-Konzentration enthielten die einzelnen Ansätze für die reverse Transkription zwischen 350 ng und 500 ng RNA. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis hergestellt und die fertige cDNA verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.3.10.1 messenger RNA

Die Synthese von cDNA aus mRNA wurde mittels Omniscript Reverse Transkriptase (ORT) Kit durchgeführt. Um eine Verunreinigung mit DNA auszuschließen, erfolgte jedoch zunächst ein DNA-Verdau der Proben. Hierfür wurde das DNase I Kit von Invitrogen™ verwendet. Die Reaktionsansätze (siehe *Tabelle 3*) wurden für eine Stunde bei 37°C im Heizblock inkubiert, gefolgt von fünf Minuten bei 94° um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren.

Tabelle 3: Pipettierschema cDNA Synthese aus mRNA

Pipettierschema

2 µl RT Puffer
2 µl dNTP's
1 µl Oligo dT Primer
1 µl RT
500 ng RNA in max. 14 µl H₂O

2.3.10.2 microRNA

Für die zu untersuchenden microRNAs wurde das TaqMan® Reverse Transcription Kit der Firma Life Technologies verwendet. Dabei wurde nach dem Protokoll für Multiplex™-Reaktionen vorgegangen und ein individueller Primerpool verwendet. Dieser Pool enthielt die 5X Primer für die miRNA-15b und die SnoRNA202 aus dem TaqMan® MicroRNA Assay.

Bei allen Kits wurde entsprechend der Herstellerprotokolle vorgegangen. Die Mengen der verwendeten Reagenzien sind *Tabelle 4* zu entnehmen.

Tabelle 4: Pipettierschema cDNA Synthese aus microRNA

Pipettierschema

1,5 µl Buffer
0,3 µl dNTP's
0,19 µl RNase-Inhibitor
1,5 µl Multiscribe RT
6 µl Primerpool (0,1X each)
350 ng bis 500 ng RNA in max. 5,51 µl
H₂O

2.3.11 Real-Time PCR

Im Anschluss an die Synthese der cDNA erfolgte die Quantifizierung der zu untersuchenden miRNAs und mRNAs mit Real-Time PCR.

Das Gesamtreaktionsvolumen bestand aus 10µl, die genauen Pipettier- und Temperaturschemata für die Real-Time PCR sind *Tabelle 5* und *Tabelle 6* zu entnehmen.

Zur internen Kontrolle wurden die Proben jeweils als Duplikate angelegt und mit Leerwerten ohne cDNA - zur Überprüfung der Reinheit des benutzten Wassers - verglichen. Die Fluoreszenz wurde mit dem Rotorgene 3000 detektiert und graphisch dargestellt. Zur Berechnung der relativen Expression kamen die *housekeeper* L32 (für mRNA) und snoRNA202 (für microRNA) zum Einsatz.

Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte mit der $\Delta\Delta CT$ Methode nach folgender Formel:

$$\Delta Ct = Ct(target) - Ct(housekeeper)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(treated) - \Delta Ct(control)$$

$$Normalized\ target\ gene\ expression = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.3.11.1 messenger RNA

Für die Herstellung der Reaktionsansätze wurde SYBR® Green mit den entsprechenden *forward* und *reverse* Primern der zu untersuchenden Zielgene verwendet.

Tabelle 5: Pipettier- und Temperaturschema Real-Time PCR messenger RNA

Pipettierschema	Temperaturschema
5 µl SYBR® Green	Hold
3,5 µl Nuclease freies Wasser	15 min 95° Aktivierung
0,5 µl forward und reverse Primer	PCR: 45 Zyklen
1 µl cDNA Probe	15 s 94° Denaturierung
	30 s 58° Annealing
	30 s 72° Amplifikation
	5 min Melt

2.3.11.2 microRNA

Für die zu untersuchenden microRNAs wurde der TaqMan® microRNA Assay mit *stem loop* Primern zusammen mit dem TaqMan® Universal PCR Master Mix (beides Life Technologies) verwendet.

Tabelle 6: Pipettier- und Temperaturschemata Real-Time PCR microRNA

Pipettierschema microRNA	Temperaturschema microRNA
5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix 3,75 µl Nuclease freies Wasser 0,5 µl 20X Primer 0,75 µl cDNA	Hold 10 min 95° Aktivierung PCR: 50 Zyklen 15 s 95° Denaturierung 60 s Annealing

2.3.12 Durchflusszytometrie

Zur Auswertung der in *Kapitel 2.3.8.1* beschriebenen Transfektionsoptimierung von murinen T-Helferzellen mit Alexa Fluor 488 (cyan-green) markierter siRNA (siAF488) kam die Durchflusszytometrie zum Einsatz. Die Zellen wurden hierfür nach Abnahme aus den *wells* nicht fixiert sondern lebend mit Trägerflüssigkeit verdünnt und mit dem Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Markierung der toten Zellen angefärbt. DAPI durchdringt dabei die porös gewordenen Membranen toter Zellen und färbt DNA-Bestandteile an. Die Messung erfolgte mit dem FACS Canto II Gerät nach Herstellervorschrift.

Zunächst wurde im ersten Messfenster die Zellgröße (FSC-A) gegen die Granularität (SSC-A) dargestellt und ein Lymphozytengate gesetzt. Danach erfolgte der Ausschluss der Doubletten mittels Pulsdichte (FSC-W vs. SSC-A) und der Übertrag der *single* Zellen in ein weiteres Fenster. Dieser Schritt wurde wiederholt und erneut nur die *single* Zellen in das nächste Fenster übernommen. Danach erfolgte die Selektion der vitalen Zellen mittels Darstellung von DAPI gegen SSC-A, in der DAPI-positive Zellen als nicht vitale Zellen ausgeschlossen wurden. In der Gruppe der vitalen Zellen wurden nun die AF488 positiven Zellen gemessen, indem FITC-A gegen SSC-A im finalen Histogramm aufgetragen wurde.

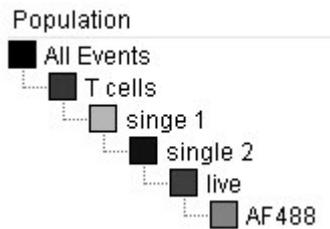


Abbildung 2: Markierungsstrategie Durchflusszytometrie.
Dargestellt ist die Hierarchie der festgelegten Punkteplotfenster.

2.3.13 ELISA

Für die Durchführung der Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) wurde das DuoSet® ELISA Mouse IFN- γ Kit der Firma R&D Systems verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Block-, Wasch- und Probenpuffer sowie die benutzten Antikörper sind *Kapitel 2.1.4* und *2.1.9* zu entnehmen.

Die Durchführung der Assays erfolgte nach Herstellerprotokoll über einen Zeitraum von zwei Tagen. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm mit dem Tecan Reader Infinite 200 Pro. Die Auswertung der Messung und Berechnungen der Konzentrationen anhand der angelegten Standardreihe wurde mithilfe der Software Magellan (Version 7.2) durchgeführt.

2.4 Statistik

Für die statistischen Analysen wurde die Software von GraphPad Prism 5® und Microsoft Office Excel 2007® verwendet. Berechnet und angegeben wurden die Mittelwerte mit Standardfehler, Ergebnisse mit p-Werten unter 0,05 wurden als statistisch signifikant eingeordnet. Zur Anwendung kamen der gepaarte und ungepaarte t-Test sowie der one-way ANOVA.

3 ERGEBNISSE

3.1 Die microRNA-15b und IFN- γ : Zielgenanalyse und experimentelle Validierung

3.1.1 *In silico* Analyse zeigt IFN- γ als Zielgen der microRNA-15b

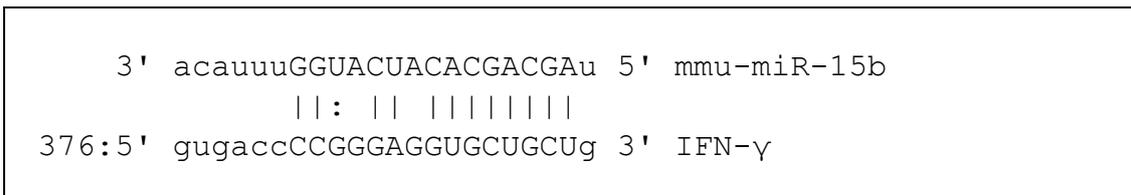
Zunächst sollte eine datenbankgestützte Zielgenanalyse die Fragestellung klären, ob IFN- γ ein vorhergesagtes Zielgen der miRNA-15b und somit ein interessantes Gen für die Untersuchung der Effektorfunktion der miRNA-15b in T-Helferzellen darstellt. Die Suche wurde mit der Meta-Datenbank miRecords (<http://mirecords.biolead.org/>; Xiao et al. 2009) durchgeführt, diese greift auf die Suchalgorithmen von elf¹ der bekanntesten Anbieter zurück. Mithilfe dieser Datenbank wurde eine Kreuzanalyse der miRNA-15b und des Zielgens IFN- γ mit der Fragestellung nach potentiellen Bindungsstellen gestartet. Die Ergebnisse der gefundenen Bindungsstellen sind in *Tabelle 7* zusammengefasst.

¹ DIANA-microT (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/> 2014; Maragkakis et al. 2009)
MicroInspector (<http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/> 2010)
miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do> 2014; Betel et al. 2008)
miRTarget2 (<http://mirdb.org/miRDB/> 2015; Wong und Wang 2015)
miTarget (<http://cbiit.snu.ac.kr/~miTarget/> 2014; Kim et al. 2006)
NBmiRTar (<http://wotan.wistar.upenn.edu/NBmiRTar/> 2014)
PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/> 2012)
PITA (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_dyn_data.html 2014)
RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/> 2014; Rehmsmeier et al. 2004)
TargetScan/TargetScanS (<http://www.targetscan.org/> 2014; Friedman et al. 2009; Lewis et al. 2005)
RNA22 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/> 2014; Miranda et al. 2006)

Tabelle 7: In silico Vorhersage von Bindungsstellen der mmu-miR-15b in der 3'-UTR von IFN- γ

Algorithmus	Vorhergesagte target sites der mmu-miR-15b in der IFN- γ 3'-UTR
DIANA-microT	
MicroInspector	no data retrievable
miRanda / miRBase	1
MirTarget2	
miTarget	no data retrievable
NB miRTar	
PicTar	
PITA	1
RNA22	1
RNA Hybrid	1
TargetScan/TargetScanS	

Insgesamt konnte bei neun der elf Anbieter eine erfolgreiche Datenabfrage erfolgen, von diesen neun zeigte sich bei vier Algorithmen (miRanda, PITA, RNA22 und RNA Hybrid) eine positive Vorhersage für jeweils eine mögliche Bindungsstelle der miRNA-15b in der 3'-UTR von IFN- γ . Nach Analyse dieser Ergebnisse zeigte sich, dass die vier gefundenen Bindungsstellen übereinstimmten, bei der gefundenen Sequenz handelte es sich jeweils um dieselbe 8-mer Sequenz ohne mismatches (*Abbildung 3*). Die Datenbank RNA22 fand zusätzlich noch zwei weitere mögliche Bindungsstellen innerhalb der kodierenden Sequenz von IFN- γ .

Abbildung 3: In silico vorhergesagte Bindungsstelle der mmu-miR-15b in der 3'-UTR von IFN- γ

Eine Analyse der Meta-Datenbank miRecords erbrachte folgende vorhergesagte 8-mer Bindungsstelle mit den vier unterschiedlichen Algorithmen miRanda, PITA, RNA22 und RNA Hybrid.

Angegebene **Free Energy** bei allen vier Anbietern <-20 kcal/mol (empfohlener cut-off <-20), **$\Delta\Delta G$ Score** -10.75 (PITA, empfohlener cut-off <-10), **PhastCon** (Conservation) **Score** 0.651 (miRanda, empfohlener cut-off für Konservierung zwischen Säugetieren >0.57)

3.1.2 Kotransfektion von microRNA-15b und IFN- γ 3'-UTR resultieren in reduzierter Reporterenzymaktivität

Auf Basis der durchgeführten Analyse der Interaktion zwischen miRNA-15b und IFN- γ sollte nun im nächsten Schritt mittels eines Reporterassays die vorhergesagte Bindung experimentell validiert werden. Für die Versuche wurde das Expressionsplasmid pmirGLO mit dem DLR™ Assay (beides Promega) verwendet. Die durch die Luciferasen katalysierte Substratspaltung führt zur Emission von Licht (Biolumineszenz), welche mit der Einheit Relative Light Units (RLUs) gemessen werden kann. Die Firefly-Luciferase (Reporterenzym) wurde auf die Aktivität der Renilla-Luciferase (Kontrollenzym) normalisiert und wird als relative Luciferaseaktivität angegeben.

Für die Versuche wurden HEK293 Zellen in 48 wp kultiviert und nach einer Ruhezeit von 24 h, wie in *Kapitel 2.3.2* und *2.3.3* beschrieben, transfiziert. Die Transfektion der miRNA-15b erfolgte zunächst in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 1 und 50 nM, die Auswertung der Enzymaktivität nach 24, 48 und 72 h nach Transfektion (*Abbildung 4*). Dabei mussten die Zellen vom Zeitpunkt 72 h nach Transfektion aufgrund hoher Nekroseraten verworfen werden, da sich lichtmikroskopisch eine fehlende Adhärenz und Proliferation der Zellen sowie niedrige RLUs in der Messung der Lumineszenz nachweisen ließen.

Nach 24 h (*Abbildung 4a*) konnte bei allen und nach 48 h (*Abbildung 4b*) bei fast allen Konzentrationen (ausgenommen 1 nM und 50 nM) eine signifikante Reduktion der normalisierten Luciferaseaktivität und somit indirekt eine Bindung der miRNA-15b an die IFN- γ 3'-UTR nachgewiesen werden. Im Vergleich der zwei Zeitpunkte (*Abbildung 4c*) zeigte sich eine stärkere Repression des Reporterenzyms nach 24 h im Vergleich zum Zeitpunkt 48 h nach Transfektion. Dieser Unterschied war für die Konzentrationen 1, 5 und 10 nM signifikant. Zusammenfassend konnte somit ein dosisabhängiger *knockdown* nachgewiesen werden.

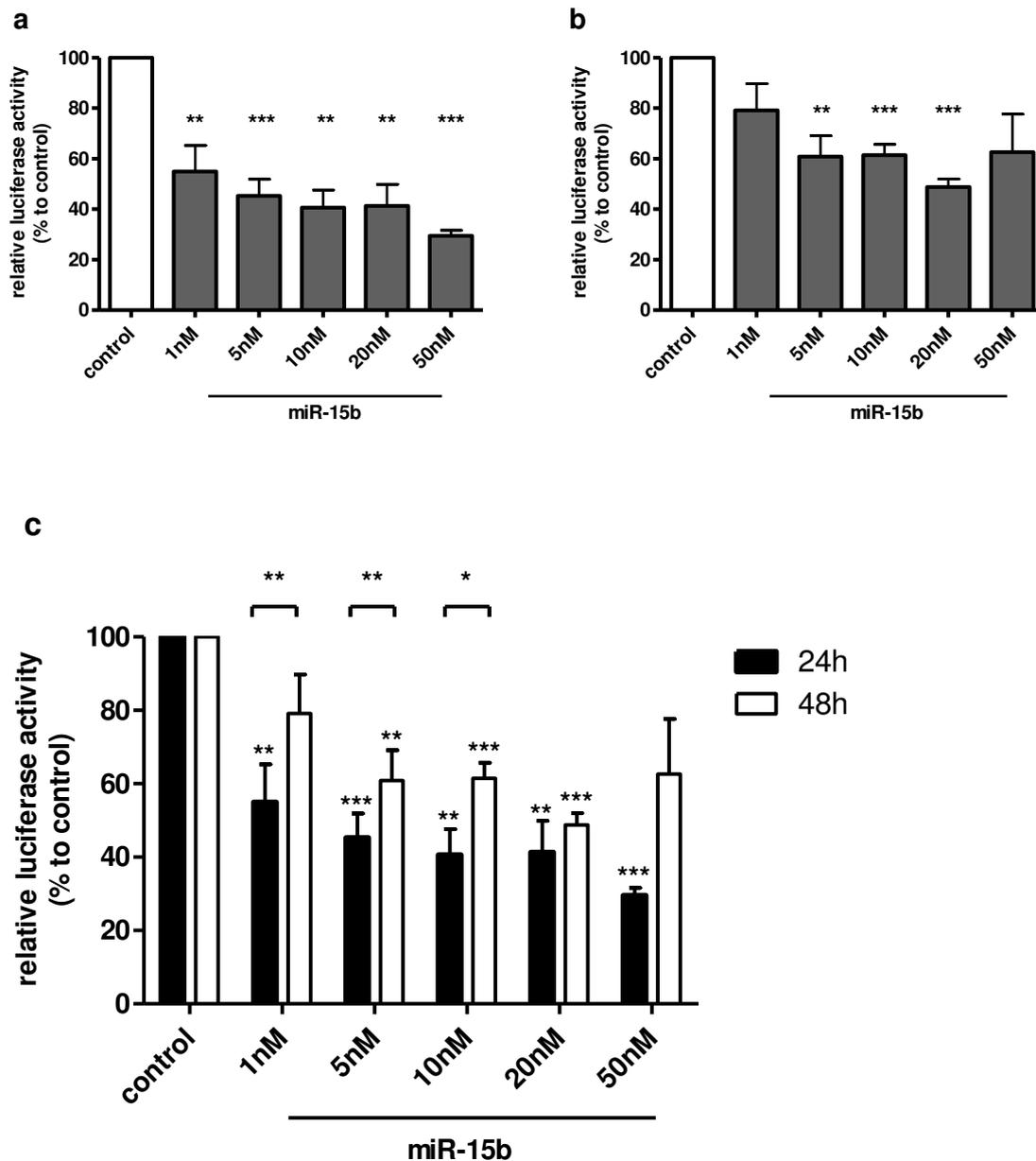


Abbildung 4: Reportengenassay miR-15b und IFN- γ 3'-UTR

Kotransfektion der miR-15b mit IFN- γ 3'-UTR in HEK293 Zellen. Die Aktivität der Luciferasen wurde nach **24 h (a)** und **48 h (b)** im Zelllysate gemessen. (c) Vergleich der zwei Zeitpunkte. Dargestellt ist die Ratio von firefly/renilla luciferase in % von der Kontrolle (100%). Mean \pm SEM berechnen sich aus zwei biologischen Kontrollen in jeweils 3 unabhängigen Transfektionen (n=3); gepaarter t-Test mit *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Anhand dieser Daten erschien es sinnvoll, für die weiteren Versuche den Auslesezeitpunkt der Enzymaktivität auf 24 h festzulegen, da es nach 48 h bei Transfektion von niedrigen Konzentrationen (1, 5, 10 nM) bereits zu einer signifikanten

Abnahme des Effektes kam. Bei einer Transfektion mit höheren Konzentrationen als 10 nM wurde wiederum eine erhöhte Toxizität – vermutlich verursacht durch die höheren Mengen an Transfektionsreagenz – , beobachtet, sodass es nahe lag, die Konzentration nicht höher als diesen Wert anzusetzen.

Der Effekt der miRNA-15b wurde nun mit einer weiteren miRNA, der miRNA-29a, als Positivkontrolle (Ma et al. 2011) verglichen (Abbildung 5). Für beide miRNAs konnte bei einer Konzentration von 10 nM eine signifikante Reduktion der normalisierten Luciferaseaktivität nach 24 h gezeigt werden. Der Effekt der miRNA-29a war mit einer Reduktion um ca. 8% jedoch nur gering ausgeprägt. Die Reduktion der Luciferaseaktivität durch die miRNA-15b zeigte sich auch hier signifikant im Vergleich sowohl zur Kontrolle als auch im Vergleich zur miRNA-29a. In der kombinierten Transfektion von jeweils 5 nM der miRNA-15b und 5nM der miRNA-29a zeigte sich eine Reduktion des Effekts der miRNA-15b, eine signifikante Suppression der Luciferaseaktivität war nicht mehr zu beobachten.

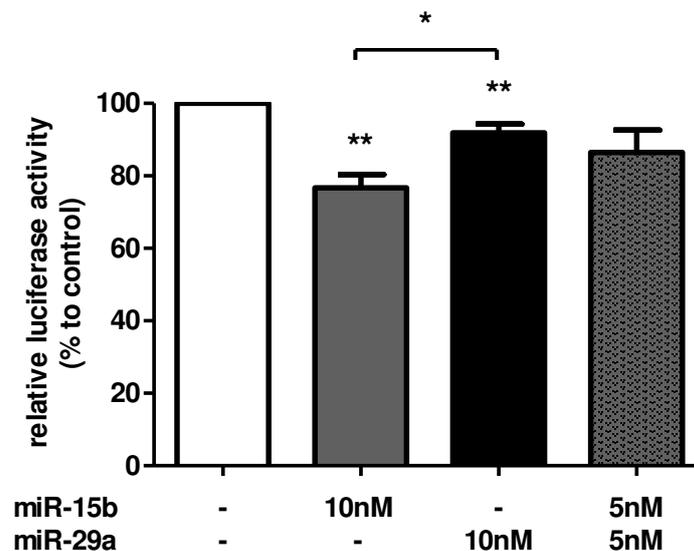


Abbildung 5: Reportengenassay miR-15b vs. miR-29a

Kotransfektion der miR-15b und miR-29a und IFN- γ 3'-UTR. Die Aktivität der Luciferasen wurde nach 24 h im Zelllysat gemessen. Dargestellt ist die Ratio von firefly/renilla luciferase in % von der Kontrolle (100%). Mean \pm SEM berechnen sich aus zwei biologischen Kontrollen in jeweils 3 unabhängigen Transfektionen (n=3); gepaarter t-Test mit *p<0,05, **p<0,01.

3.1.3 Kotransfektion von Antagomirs in gleicher Konzentration kann microRNA-Effekt nicht inhibieren

Zusätzlich wurde die Wirkung der korrespondierenden Antagomirs im gleichen Versuch untersucht (Abbildung 6). Dafür wurden sowohl die miRNA-15b als auch die -29a zusammen mit ihren jeweiligen Antagomirs in gleicher Konzentration transfiziert. Bei einer Kotransfektion von jeweils 5 nM miRNA und 5 nM Antagomir zeigte sich keine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität mehr, eine eindeutige Aufhebung des Effektes der miRNAs bei Zugabe einer äquivalente Menge an Antagomir war jedoch nicht zu sehen. In der Konsequenz wurde für die späteren Transfektionsversuche mit T-Helferzellen die Menge an Antagomir in Relation zur miRNA-Menge verdoppelt.

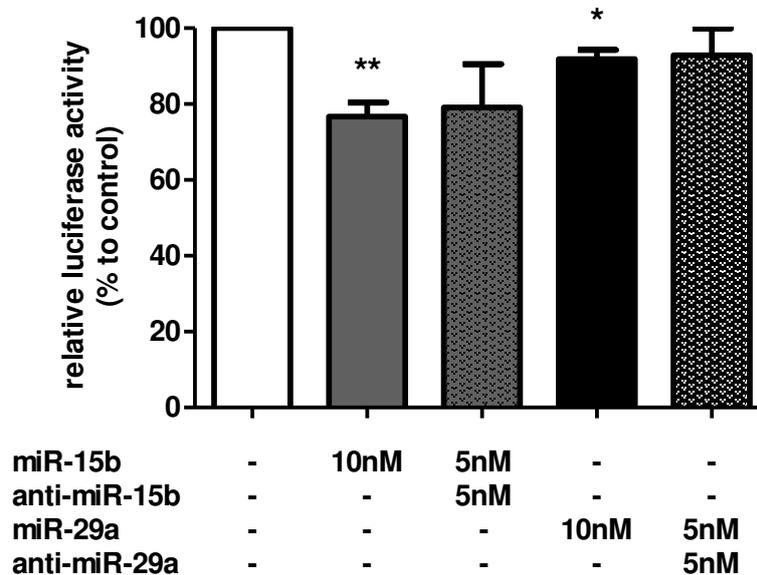


Abbildung 6: Kotransfektion der miR-15b und miR-29a mit ihren korrespondierenden Antagomirs

Kotransfektion der miR-15b und miR-29a mit ihren korrespondierenden Antagomirs und IFN- γ 3'-UTR. Die Aktivität der Luciferasen wurde nach 24 h im Zellysat gemessen. Dargestellt ist die Ratio von firefly/renilla luciferase in % von der Kontrolle (100%). Mean \pm SEM berechnen sich aus zwei biologischen Kontrollen in jeweils 3 unabhängigen Transfektionen (n=3); gepaarter t-Test mit *p<0,05, **p<0,01

3.1.4 Reduzierte Luciferaseaktivität nach Mutation der vorhergesagten Bindungsstelle

Zur weiteren Untersuchung der Interaktion der miRNA-15b mit IFN- γ wurde die vorhergesagte Bindungsstelle der miRNA-15b im IFN- γ 3'-UTR Plasmid mutiert und es wurden erneute Transfektionsversuche durchgeführt (*Abbildung 7*). In *Abbildung 7a* sind die Ausschnitte der Sequenz von Wildtyp und Mutante sowie die nunmehr veränderte Basenpaarung der 3'-UTR von IFN- γ im Bereich der Bindung zur *Seed*-Sequenz der miRNA-15b (Mutation Base 3 – 8) abgebildet. *Abbildung 7b* und *c* zeigen die erneuten Luciferase-Assays mit Wildtyp und Mutante. Die miRNA-15b wurde dabei wie in den vorherigen Versuchen mit einer Konzentration von 10 nM transfiziert und die Luciferaseaktivität nach 24 h bestimmt. Hierbei zeigte sich in den Versuchen eine weiterhin signifikant reduzierte Luciferaseaktivität beim mutierten Plasmid. Der Versuch wurde daraufhin zur Kontrolle zusätzlich zur mmu-miR-15b (QIAGEN, *Abbildung 7b*) auch mit der hsa-miR-15b (miRvana, *Abbildung 7c*) durchgeführt. Unabhängig vom verwendeten Produkt zeigte sich auch hier eine weiterhin bestehende Reduktion der Luciferaseaktivität.

Um an dieser Stelle einen unspezifischen Effekt auszuschließen, wurde die Transfektion der miRNA-15b zusammen mit einer Negativkontrolle ohne intrinsische Aktivität (negative control # 1, miRvana™ miRNA Mimic) wiederholt und die Ergebnisse der Läufe wurden verglichen. Hier zeigte sich, dass es sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante in der Negativkontrolle zu keiner Suppression der Luciferaseaktivität durch die Negativkontrolle kam (*Abbildung 7d*). Der Unterschied zwischen der Transfektion mit miRNA-15b und Negativkontrolle war in Wildtyp und Mutante statistisch signifikant.

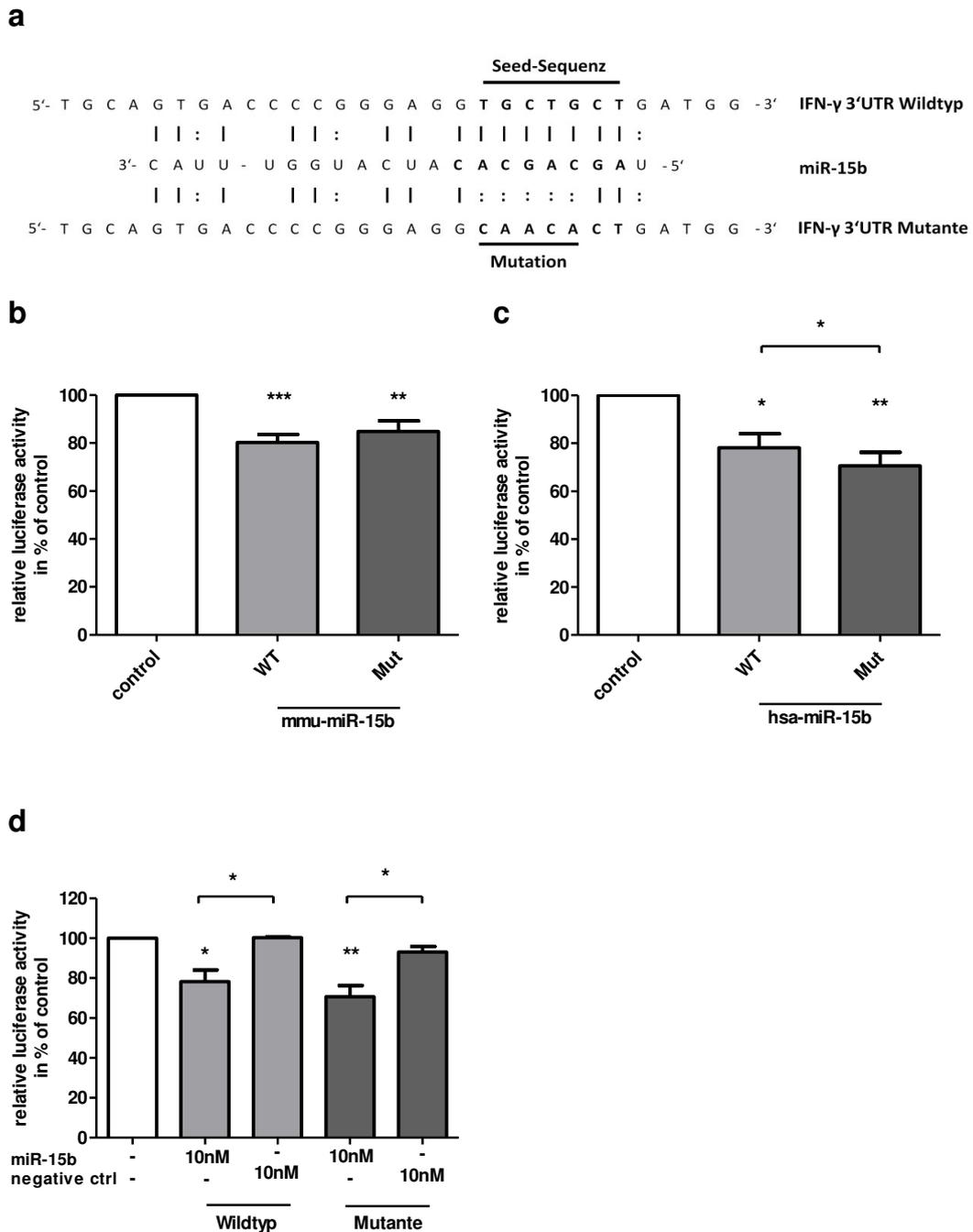


Abbildung 7: Reporterassay Wildtyp (WT) vs. Mutante (Mut)

(a) Mutation von IFN- γ 3'-UTR Dargestellt sind Wildtyp (WT) und Mutante (Mut) mit der eingefügten Mutation von 5 Basen im Bereich der vorhergesagten Bindungsstelle der miR-15b. (b, c) Reporterassay WT vs. Mut. Kotretransfektion der miR-15b mit Wildtyp oder Mutante in HEK293 Zellen. Transfektion mit mmu-miR-15b (b) oder hsa-miR-15b (c). Die Aktivität der Luciferasen wurde nach 24 h im Zellysate gemessen. Dargestellt ist die Ratio von firefly/renilla luciferase in % zur Kontrolle (100%). Mean \pm SEM berechnen sich aus zwei biologischen Kontrollen in jeweils 4 unabhängigen Transfektionen (n=4), gepaarter t-Test mit *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

(d) Reporterassay miR-15b vs. negative control in WT und Mut. Kofransfektion der miR-15b und negative control (miRvana) mit Wildtyp oder Mutante in HEK293 Zellen. Die Aktivität der Luciferasen wurde nach 24 h im Zelllysats gemessen. Dargestellt ist die Ratio von firefly/renilla luciferase in % zur Kontrolle (100%). Mean \pm SEM berechnen sich aus zwei biologischen Kontrollen in jeweils 3 unabhängigen Transfektionen (n=3), ungepaarter t-Test mit *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Zusammengefasst konnte für die miRNA-15b eine signifikante, dosisabhängige Reduktion der Luciferaseaktivität und somit indirekt eine Bindung an die 3'-UTR von IFN- γ nachgewiesen werden. Diese Reduktion war auch im Vergleich zu einer Negativkontrolle ohne intrinsische Aktivität und im Vergleich zur miRNA-29a signifikant. Eine Inhibition dieses Effektes konnte mit der Mutation von fünf der acht Basen der vorhergesagten Bindungsstelle nicht erreicht werden.

3.2 Expressionslevel und -kinetik der microRNA-15b in *in vitro* differenzierten T-Helferzellen

Die miRNA-Arrays welche als Ausgangspunkt dieser Dissertation dienten, hatten eine vermehrte Expression der miRNA-15b in T_H2-Zellen aus den Lungen von Balb/c Mäusen mit dem Phänotyp der akut allergisch entzündeten Lunge aufgezeigt. Es sollte nun die Fragestellung geklärt werden, ob bereits in der Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu reifen T_H1- und T_H2-Zellen eine unterschiedliche Expression der miRNA-15b nachweisbar ist, oder ob die in den miRNA-Arrays gesehenen Unterschiede erst im entzündlichen Milieu des allergischen AB entstehen. Hierfür wurden naive T-Helferzellen aus murinen Milzen isoliert und über sechs Tage lang, wie in *Kapitel 2.3.7* beschrieben, zu reifen T_H1- und T_H2-Zellen differenziert. Ein Teil der naiven T-Helferzellen wurde darüber hinaus ohne linienspezifische Stimulanzen für 24 h inkubiert und als T_H0-Zellen zur Kontrolle und zur Normalisierung der relativen Expression verwendet.

3.2.1 Protokoll zur *in vitro* Differenzierung von T-Helferzellen zeigt deutliche Expression von Leitzytokinen nach sechs Tagen

Das in *Kapitel 2.3.7* beschriebene und für die vorliegenden Versuche verwendete Protokoll zur *in vitro* Differenzierung von murinen T-Helferzellen sieht eine Differenzierung über sechs Tage vor, nach der eine stabile Expression von Leitzytokinen und distinkten Oberflächenmarkern der zwei Subtypen von T-Helferzellen zu erwarten ist. Vor Übernahme des Protokolls und Beginn der Versuche sollte der Erfolg des Protokolls, eine gelungene Differenzierung, zunächst überprüft werden. Hierfür wurde nach abgeschlossener Differenzierung RNA aus den kultivierten T-Helferzellen isoliert und die relative Expression der mRNA der Leitzytokine IFN- γ sowie IL-13 und IL-5 mittels Real-Time PCR überprüft (*Abbildung 8*). Hierbei zeigte sich ein klarer, linienspezifischer Unterschied in der relativen Expression der untersuchten Zytokine zwischen T_H1- und T_H2-Subtyp, sodass die Überprüfung des Protokolls als erfolgreich gelten und dieses für die weiteren Versuche ohne Modifikationen übernommen werden konnte.

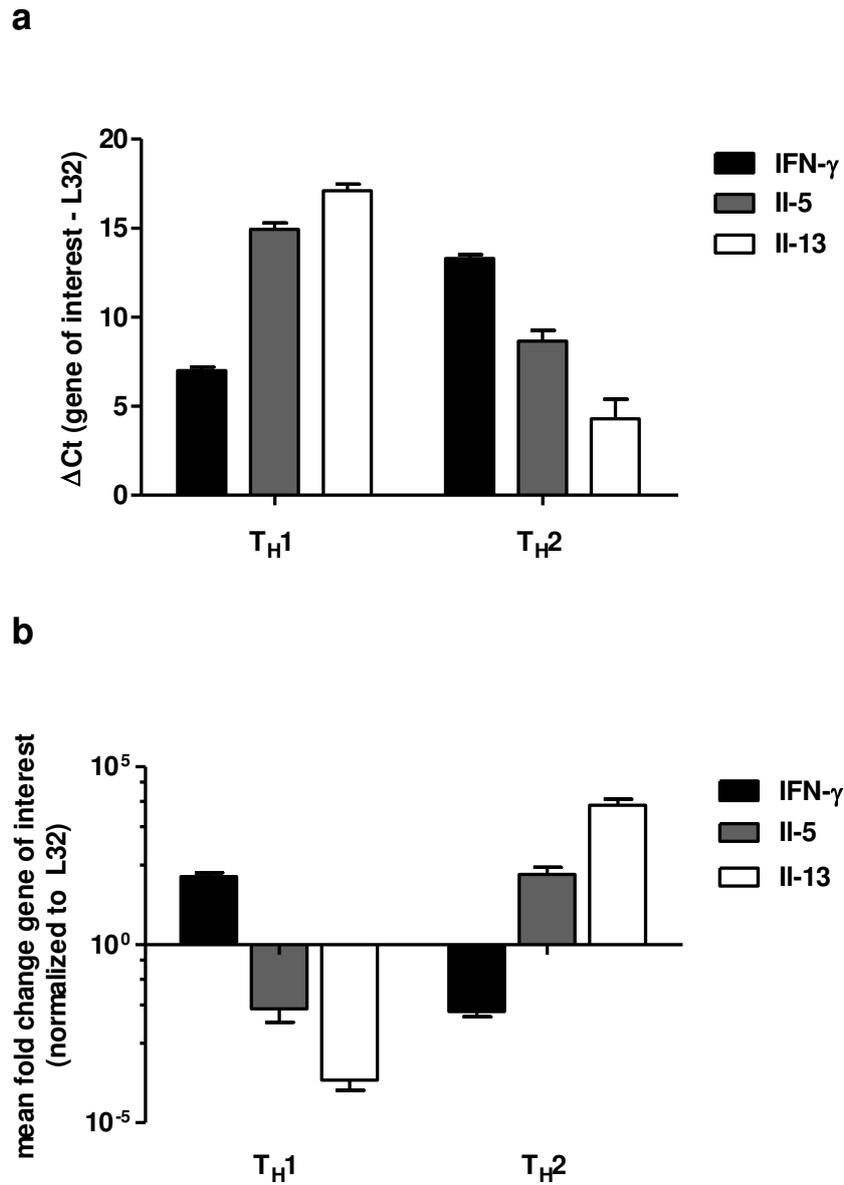


Abbildung 8: Protokoll zur *in vitro* Differenzierung von T-Helferzellen

Es erfolgte eine sechstägige Differenzierung von T-Helferzellen zu reifen T_H1 - und T_H2 -Zellen. Anschließend wurde mittels Real-Time PCR die relative Expression der Leitzytokine IFN- γ , IL-13 und IL-5 überprüft. **(a)** zeigt die ΔCt (GOI - L32) Werte, **(b)** die $\Delta\Delta Ct$ Werte (GOI/L32) als mean fold change auf logarithmischer Skala. Mean \pm SEM berechnen sich aus zwei biologischen Replikaten aus einem Experiment mit $n=4$ Individuen (Balb/c naïv). **GOI = gene of interest**

3.2.2 Erhöhte Expression der miRNA-15b während der *in vitro* Differenzierung von T-Helferzellen

Um nun die Expressionslevel der miRNA-15b während der Differenzierungsphase von T-Helferzellen darzustellen, wurde jeweils an den Tagen 1, 3 und 6 während bzw. nach abgeschlossenem Protokoll ein Teil der Zellen abgenommen und aus ihnen RNA für die Durchführung von Real-Time PCR isoliert.

Abbildung 9 zeigt die relative Expression der miRNA-15b in den *in vitro* differenzierten T-Helferzellen im Vergleich zu naiven T-Helferzellen. Insgesamt konnte eine erhöhte Expression der miRNA-15b in T_{H1}-Zellen im Vergleich zu naiven T-Helferzellen für alle drei untersuchten Zeitpunkte gezeigt werden. In den T_{H2} Zellen zeigte sich an Tag 1 keine, zu den beiden späteren Zeitpunkten jedoch eine erhöhte Expression. Nach abgeschlossener Differenzierung (Tag 6) zeigte sich ein mittlerer fold change von 2,3 (T_{H1}) bzw. 2,2 (T_{H2}) im Vergleich zu T_{H0}-Zellen. In beiden Subtypen konnte über den Verlauf der Differenzierung eine Zunahme der Expression von Tag 1 zu Tag 6 nachgewiesen werden.

In der Gegenüberstellung von T_{H1}- und T_{H2}-Zellen war an Tag 1 eine erhöhte Expression in den T_{H1}-Zellen zu sehen, an den beiden späteren Zeitpunkten waren keine Unterschiede in der Expression der miRNA-15b in T_{H1}- und T_{H2}-Zellen detektierbar.

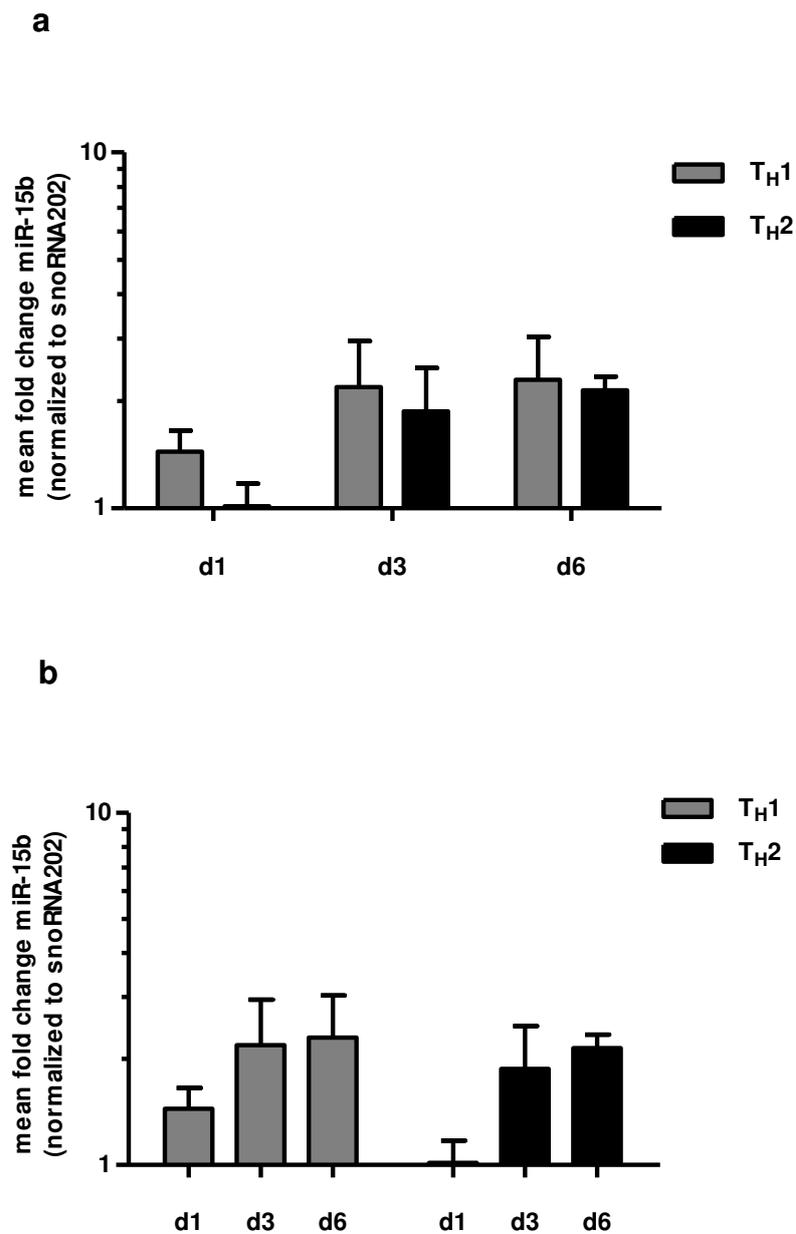


Abbildung 9: Kinetik der relativen Expression der miR-15b während der Differenzierung von TH1- und TH2-Zellen im Vergleich zu TH0-Zellen

Dargestellt ist die relative Expression der miR-15b auf logarithmischer Skala zu den Zeitpunkten d1, d3 und d6 in in vitro differenzierten TH1- und TH2-Zellen. (a) zeigt den Vergleich zwischen TH1- und TH2-Zellen. (b) Vergleich der Zeitpunkte. Die Berechnung erfolgte mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode als mean fold change im Vergleich zu TH0-Zellen. Als housekeeping RNA und zur Normalisierung wurde snoRNA202 verwendet. Mean \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit n = 11 Individuen gesamt (Balb/c, naiv).

3.3 Expression von IFN- γ in T-Helferzellen nach Transfektion mit microRNA-15b und anti-microRNA-15b

Wie beschrieben (*Kapitel 3.1.2*) konnten die durchgeführten Reporterassays eine miRNA/mRNA-Interaktion zwischen der miRNA-15b und der 3'-UTR von IFN- γ nachweisen. Da dieser Nachweis jedoch noch keine Aussage über den tatsächlichen Einfluss einer miRNA auf die mRNA- oder gar Proteinexpression ihres Zielgens liefern kann, sollten weitere Versuche zur Effektorfunktion der miRNA-15b durchgeführt werden. Um den physiologischen Einfluss einer miRNA zu testen eignen sich dabei Transfektionsversuche mit miRNA Mimics und bzw. oder Antagomirs. In den folgenden Versuchen wurde nun also der Effekt der miRNA-15b auf die mRNA- und Proteinexpression von IFN- γ in T-Helferzellen mittels der Transfektion von miRNA-15b und anti-miRNA-15b untersucht.

3.3.1 HiPerFect als Alternative für die Transfektion von T-Helferzellen

Primäre T-Zellen gelten generell, wie auch andere primäre Zellen, als schwierig zu transfizieren. Zu Beginn der Transfektionsversuche sollte daher zunächst eine geeignete Transfektionsmethode gefunden werden. Hierfür wurden zwei Transfektionsreagenzien (HiPerFect und siPORT™) mit der Technik der Nucleofection™ (Amaya Nucleofector™) verglichen. Die genauen Bedingungen der einzelnen Transfektionen sind *Kapitel 2.3.8.1* zu entnehmen. Die Transfektionseffizienz wurde durch die Transfektion einer fluoreszenz-markierten siRNA (siAF488) überprüft, indem die Anzahl der AF488 positiven Zellen post Transfektion durchflusszytometrisch bestimmt und als Maß für die transfizierbaren Zellen gewertet wurde. Für die Nucleofektionsversuche wurde zusätzlich, wie vom Hersteller empfohlen, zur Kontrolle der Transfektionseffizienz das Plasmid pmaxGFP® transfiziert, welches für das grün-fluoreszierende Protein maxGFP™ kodiert.

Im Vergleich der beiden Transfektionsreagenzien siPORT™ und HiPerFect zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt der Transfektionseffizienz. Bei der Transfektion mit HiPerFect waren bei einer eingesetzten Menge von 0,375 μl / well (96 wp) lediglich 3,5 % der Zellen transfiziert. Mit 1,5 μl / well stieg diese Zahl auf 31,8 % der Zellen an, eine weitere Verdopplung auf 3 μl / well brachte jedoch nur noch einen minimalen

Zuwachs auf 33,1 % transfizierte Zellen (*Abbildung 10a*). Auch das Reagenz siPORT™ zeigte einen ähnlichen Effekt, jedoch mit insgesamt deutlich geringeren Werten. Die maximale erreichte Transfektionseffizienz lag mit 0,5 µl eingesetztem Reagenz bei 14,4 %, bei einer weiteren Verdopplung auf 1 µl kam es jedoch bereits wieder zu einem deutlichen Abfall auf 10,5 % (*Abbildung 10b*).

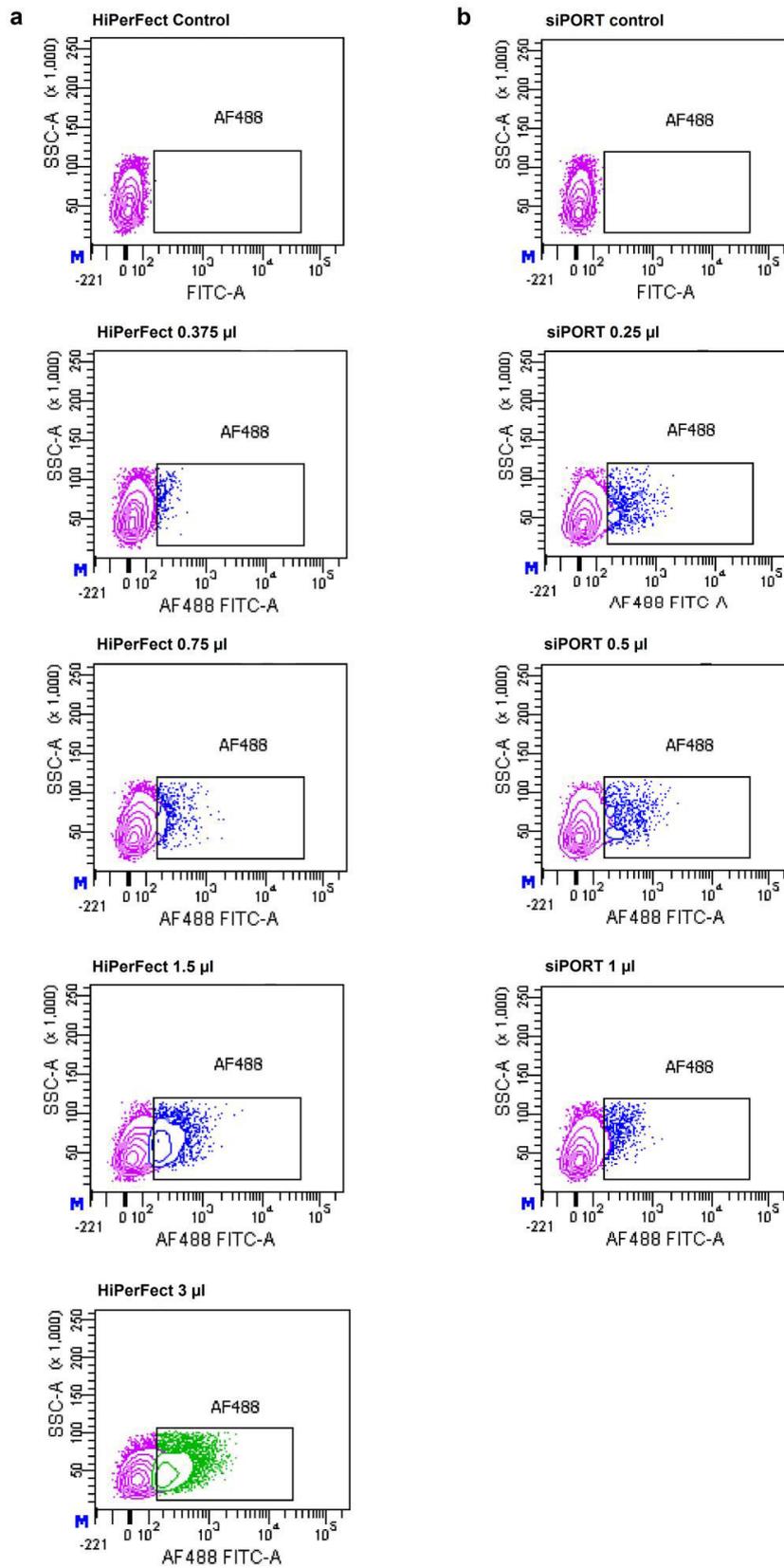


Abbildung 10: Zugehörige Erläuterungen auf der folgenden Seite

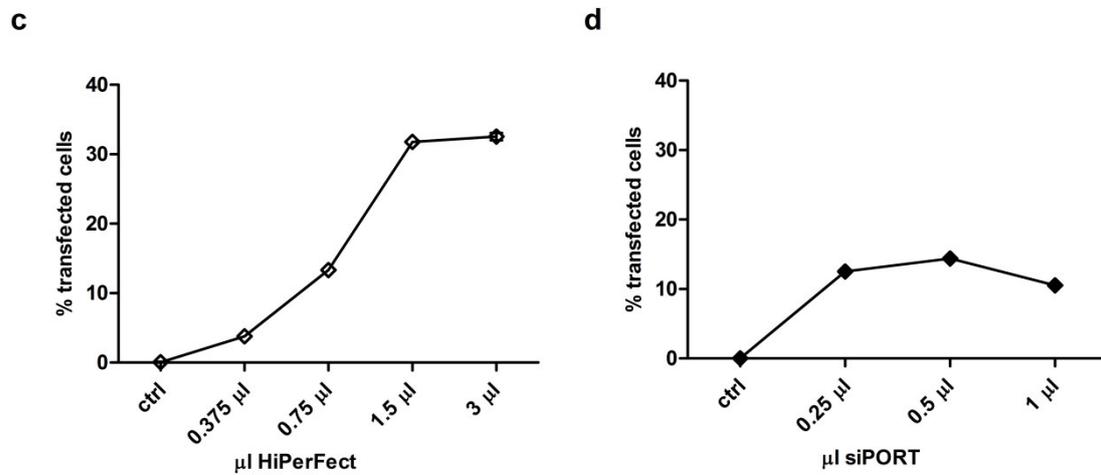


Abbildung 10: Transfektionseffizienz HiPerFect vs. siPORT™

In vitro differenzierte T-Helferzellen wurden mit Fluoreszenz-markierter siRNA (siAF488) und HiPerFect (a) oder siPORT™ (b) in den angegebenen Konzentrationen transfiziert. Dargestellt sind die FITC-A positiven Zellen 4 h nach Transfektion. Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen zu % der transfizierten Zellen (c, d).

Die Auswertung der mit dem Nucleofector™ transfizierten Zellen (Abbildung 11) ergab unterschiedliche Ergebnisse. Die Transfektionseffizienz wurde sowohl über die Transfektion mit dem herstellereigenen Kontrollplasmid pmaxGFP® überprüft, welches für das grün-fluoreszierende Protein maxGFP® kodiert. Hierbei konnte nach 4 h eine Anzahl von 41,1 % transfizierten Zellen verzeichnet werden. Die mit fluoreszenz-markierter siRNA siAF488 transfizierten Zellen zeigten jedoch ein deutlich schlechteres Ergebnis der Transfektionseffizienz mit lediglich 4 % transfizierten Zellen.

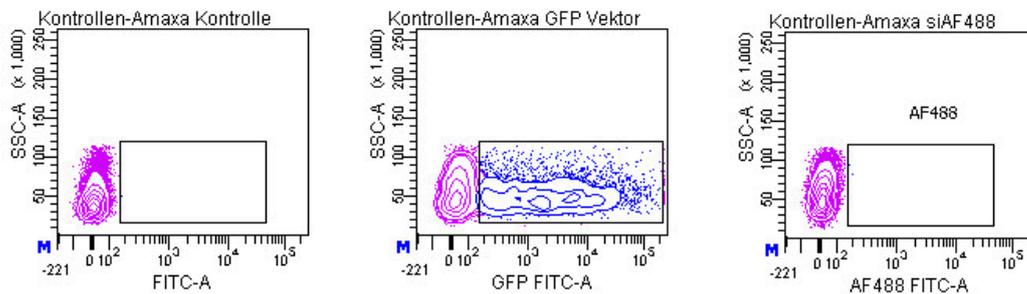


Abbildung 11: Transfektionseffizienz Amaxa Nucleofection™

In vitro differenzierte T-Helferzellen wurden mit dem pmaxGFP® Kontrollplasmid und Fluoreszenz-markierter siRNA (siAF488) per Nucleofection™ transfiziert. Dargestellt sind die FITC-A positiven Zellen 4 h nach Transfektion.

Zum Vergleich der drei Methoden wurde sowohl die Prozentzahl an lebendigen Zellen nach Transfektion (DAPI negativ, *Abbildung 12a*) als auch die Prozentzahl an transfizierten Zellen betrachtet (FITC-A positiv, *Abbildung 12b*). Hierbei zeigte sich, dass die Nucleofection™ beim Vergleich der vitalen Zellen 4 h nach Transfektion die schlechtesten Werte aufwies. Die mit HiPerFect bzw. siPORT™ transfizierten Zellen wiesen in diesem Aspekt hingegen kaum Unterschiede vor und nach Transfektion auf. Die Transfektionseffizienz war wiederum für die mit pmaxGFP® und Nucleofector®-transfizierten Zellen mit 41,1 % am höchsten im Vergleich der drei Methoden. Die Transfektionseffizienz mit siPORT™ zeigte sich als den beiden anderen Methoden hinsichtlich der erreichten Transfektionseffizienz deutlich unterlegen. Die mit HiPerFect transfizierten Zellen schnitten hingegen mit einer Transfektionseffizienz von 33,1 % zwar schlechter ab als die Nucleofector™-transfizierten Zellen, zeigten jedoch deutlich günstigere Werte im Bereich der toten Zellen nach Transfektion, was den Unterschied in der Transfektionseffizienz wiederum deutlich relativierte. Bei Einbezug der toten Zellen nach Transfektion, zeigte HiPerFect sogar insgesamt eine günstigere Transfektionseffizienz mit Blick auf die Grundgesamtheit. Aufgrund dieser Ergebnisse und einer Abwägung der Kosten und Nutzen, wurde die Entscheidung für das Transfektionsreagenz HiPerFect getroffen. Dieses sollte in der höchsten Konzentration von 3 µl pro well (96 wp) bzw. 6 µl / well (48 wp) angewendet werden.

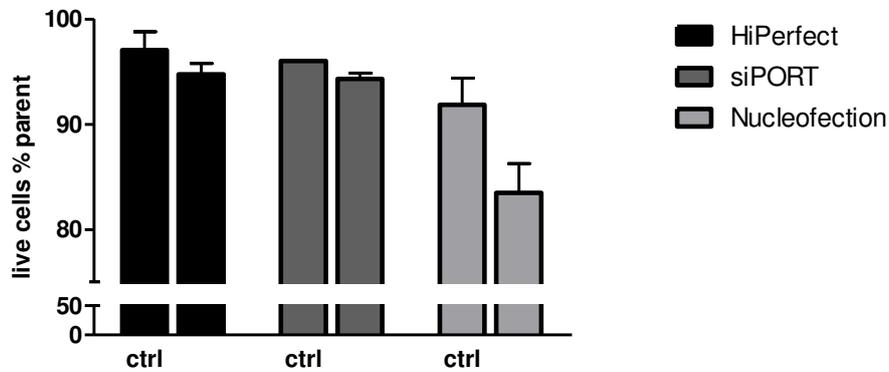
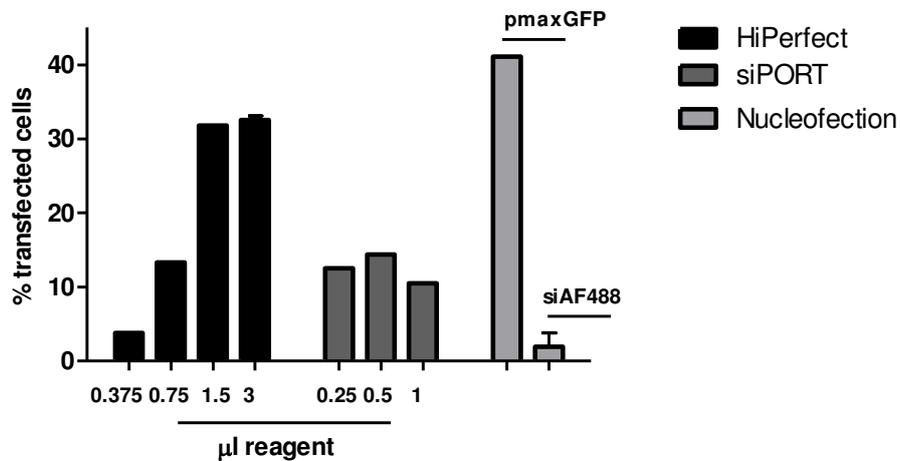
a**b**

Abbildung 12: Vergleich HiPerFect, siPORT™ und Nucleofection™

(a) Dargestellt sind die lebenden Zellen 4 h nach Transfektion (DAPI negativ) im Vergleich der drei angewandten Methoden. (b) Vergleich der erreichten Transfektionseffizienzen. Daten aus zwei unabhängigen Transfektionen, (siPORT eine Transfektion) mit $n = 3$ Individuen gesamt. Auswertung mittels Durchflusszytometrie. Markierung der toten Zellen mit DAPI, Detektion der siAF488 bzw. pmaxGFP® positiven Zellen FITC-A vs. SSC-A.

3.3.2 Transfektion von *in vitro* differenzierten T-Helferzellen

Zunächst sollte die Transfektion der T-Helferzellen mit miRNA-15b bzw. anti-miRNA-15b *in vitro* getestet werden. Naive T-Helferzellen wurden hierfür aus murinen Milzen isoliert und zu reifen T-Helferzellen differenziert. Unter der Prämisse, dass miRNAs vornehmlich inhibitorischen Einfluss auf die von ihnen regulierten Zielgene ausüben, wäre dementsprechend bei einem Effekt der miRNA nach Transfektion mit einer verminderten IFN- γ -Expression zu rechnen. Umgekehrt würde eine Transfektion mit anti-miRNA-15b einen Anstieg der IFN- γ -Expression erwarten lassen. Auf Basis dieser Überlegungen sollten die differenzierten T_H1-Zellen mit hoher endogener IFN- γ -Expression mit miRNA-15b transfiziert werden. Da die IFN- γ -Expression in T_H2-Zellen an sich schon niedrig ist, erschien der Versuch einer zusätzlichen Senkung durch miRNA-15b bei dieser Zellpopulation wenig sinnvoll, sodass diese mit anti-miRNA-15b transfiziert wurden. Da in den Luciferaseassays eine Inhibierung der miRNA-15b mit gleichen Konzentrationen von anti-miRNA-15b nicht gelungen war, sollte für die kommenden Versuche die jeweilige relative Menge an Antagomir verdoppelt werden. Aufgrund der schwierigen Transfizierbarkeit mussten dabei absolut betrachtet höhere Konzentrationen als in den Luciferaseassays gewählt werden: 100 nM der miRNA-15b bzw. 200 nM der anti-miRNA-15b. Um den Erfolg der Transfektion zusätzlich zu überprüfen, wurden anschließend zunächst die miRNA-Expressionslevel 24 h nach Transfektion der Zellen überprüft

Dabei zeigte sich mit einem ca. 500-fach erhöhten *mean fold change* der relativen Expression in den mit miRNA-15b transfizierten T_H1-Zellen ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (*Abbildung 13a*). In den mit anti-miRNA-15b transfizierten T_H2-Zellen war keine verringerte Expression der miRNA-15b-Expression zu messen.

Daraufhin wurde nach einer Ruhezeit von 24 h die relative Expression der mRNA von IFN- γ per Real-Time PCR bestimmt. Hier zeigte sich eine verminderte Expression nach Transfektion der T_H1-Zellen mit miRNA-15b, diese war jedoch nur leicht erniedrigt und nicht statistisch signifikant (*Abbildung 13b*). In der T_H2-Zellpopulation zeigte sich gleichzeitig eine nicht signifikant erhöhte Expression nach Transfektion mit anti-miRNA-15b.

Desweiteren wurde die IFN- γ -Konzentration im Zellkulturmedium nach der Transfektion mittels ELISA analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die IFN- γ -Konzentration korrespondierend zur relativen Expression an mRNA anstieg bzw. abfiel (Abbildung 13c, d).

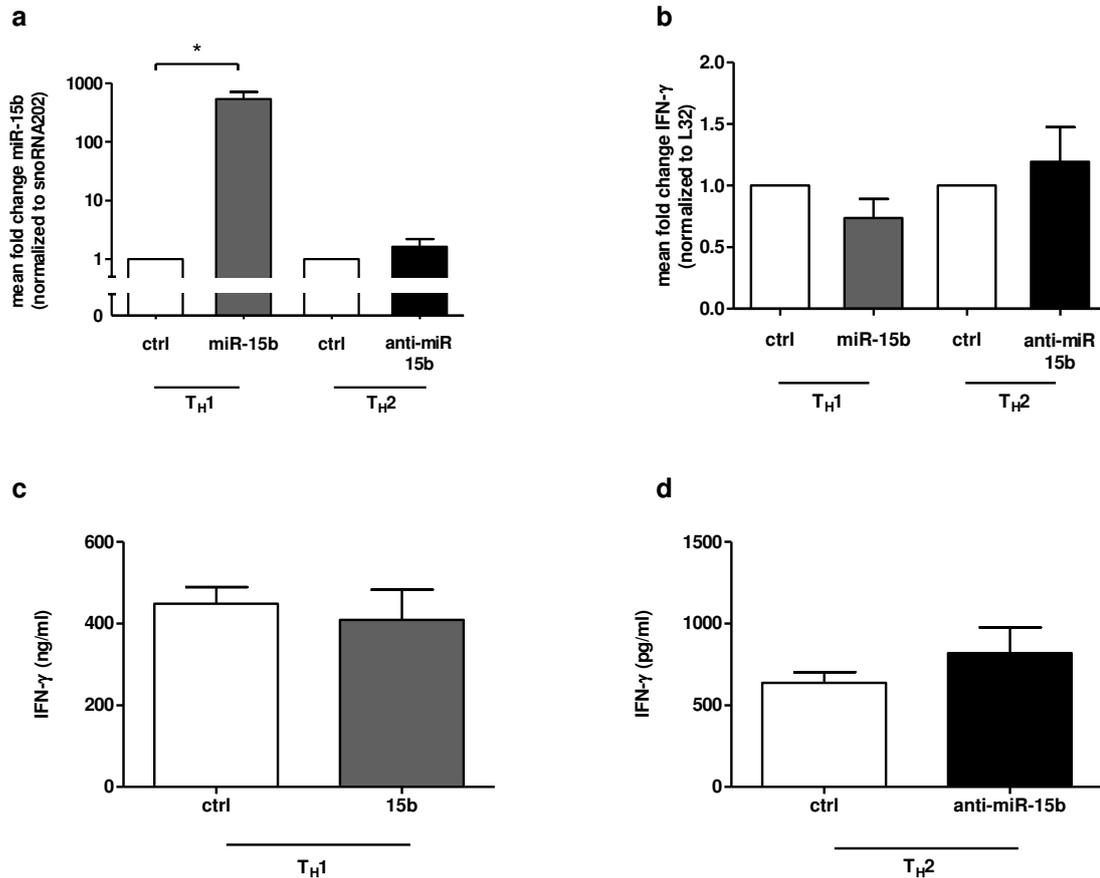


Abbildung 13: Transfektion von *in vitro* differenzierten T-Helferzellen

(a) Kontrolle der miRNA-15b-Level post Transfektion (Real-Time PCR). Mean fold change der miRNA-15b, normalisiert mit snoRNA202. Mean \pm SEM aus 2 wells/Gruppe mit n= 2 Individuen . One-way ANOVA mit *p<0,05.

(b) IFN- γ mRNA-Expression post Transfektion (Real-Time PCR). Mean fold change von IFN- γ , normalisiert mit L32. Mean \pm SEM aus 2 unabhängigen Transfektionen mit jeweils 2 wells/Transfektion und Gruppe mit n= 3 Individuen gesamt. One-way ANOVA.

(c,d) IFN- γ im Zellkulturmedium post Transfektion (ELISA). Mean \pm SEM aus 2 wells/Gruppe mit n= 1 Individuum. Unpaired t-Test.

3.3.3 Transfektion von T-Helferzellen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge

Nach Abschluss der *in vitro* Versuche, die keine signifikanten Effekte zeigten, wurde im Anschluss die Transfektion *ex vivo* im Asthma- Phänotyp wiederholt. Handlungsleitend war dabei die Überlegung, dass die Expression und Interaktion der miRNA-15b mit dem Zielgen IFN- γ durch das entzündliche Mikromilieu des allergischen AB beeinflusst sein könnte und somit *in vitro* nicht (vollständig) abgebildet wird. Diesmal wurden aus Lymphknoten isolierte CD4+ Zellen aus dem Modell der akut allergisch entzündeten Lunge transfiziert. Diese Fraktion enthält T-Helferzellen unterschiedlicher Populationen, die zwischen Lunge und Lymphknoten zirkulieren. Um dabei einen genauere Überprüfung des Transfektionserfolges der einzelnen Versuche zu erhalten, wurde jeweils erneut vor Auswertung der mRNA-Expression bzw. der Zytokinkonzentration im Zellkulturmedium die miRNA-Expression nach Transfektion mittels Real-Time PCR bestimmt.

Auch bei immer gleichbleibenden Konzentrationen von verwendeten miRNA Mimics, lag die relative Expression der miRNA-15b nach Transfektion zwischen einem 200-fachen und maximal 2000-fach erhöhten *mean fold change* im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle (*Abbildung 14a*).

Auf mRNA-Ebene ließ sich nach Transfektion mit miRNA-15b keine Reduktion der Expression von IFN- γ nachweisen, auch ein diesbezüglicher Nachweis einer Expressionsänderung auf Proteinebene mittels ELISA ließ sich nicht finden. Nach Transfektion von anti-miRNA-15b konnte auf Proteinebene keine Erhöhung von IFN- γ nachgewiesen werden, signifikant fiel jedoch die Erhöhung der Expression von IFN- γ auf mRNA-Ebene nach der Transfektion von anti-miRNA-15b aus. (*Abbildung 14b,c*). Nach Transfektion mit anti-miRNA-15b zeigte sich ein *mean fold change* von IFN- γ von 16,38 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

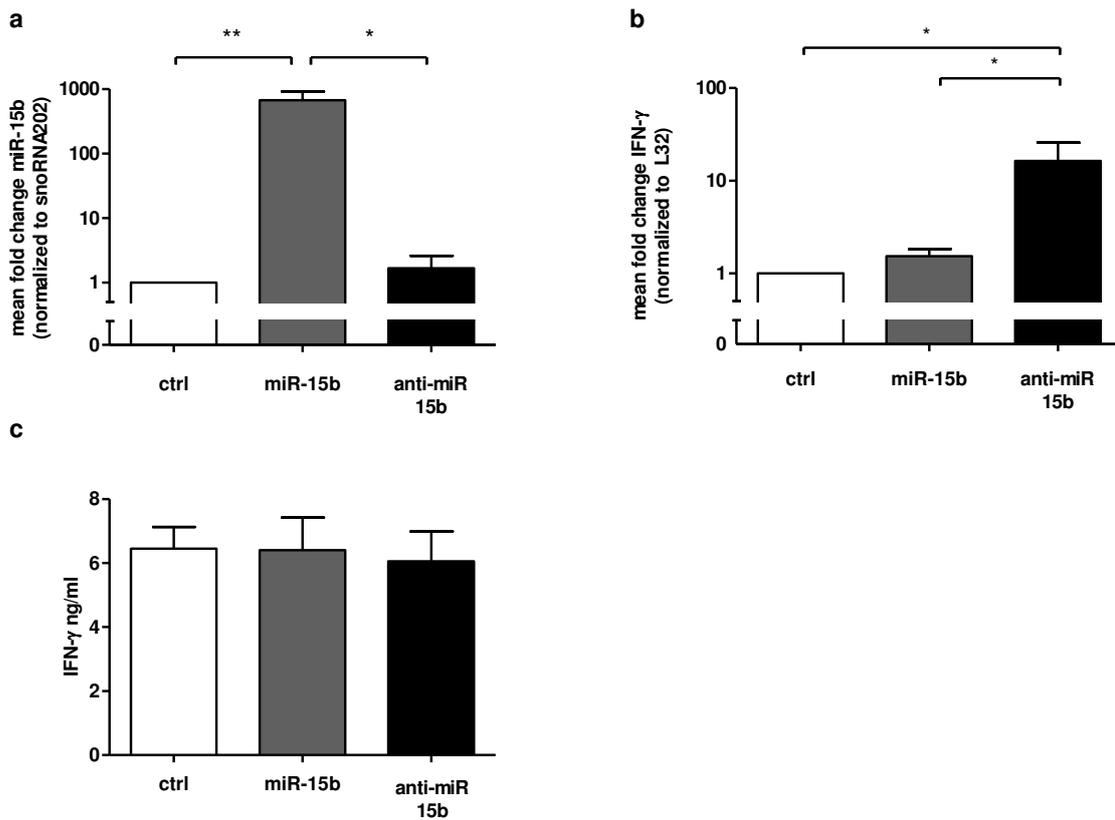


Abbildung 14: Transfektion von *ex vivo* gewonnenen T-Helferzellen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge

(a) Kontrolle der miRNA-15b-Level post Transfektion (Real-Time PCR). Mean fold change der miRNA-15b, normalisiert gegen snoRNA202. Mean \pm SEM aus vier unabhängigen Transfektionen mit je 2 wells pro Gruppe und n= 9 Individuen gesamt. One-way ANOVA mit *p<0,05, **p<0,01.

(b) IFN- γ mRNA-Expression post Transfektion (Real-Time PCR). Mean fold change von IFN- γ , normalisiert gegen L32. Mean \pm SEM aus 5 unabhängigen Transfektionen mit jeweils 2 wells pro Transfektion und Gruppe mit n= 12 Individuen gesamt. One-way ANOVA mit *p<0,05.

(c) IFN- γ im Zellkulturmedium post Transfektion (ELISA). Mean \pm SEM aus 5 unabhängigen Transfektionen mit 2 wells/Gruppe mit n= 12 Individuen gesamt. One-way ANOVA..

4 DISKUSSION

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Expression der miRNA-15b in unterschiedlichen Populationen von T-Helferzellen *in vitro* sowie des Einflusses der miRNA-15b auf die Expression von IFN- γ in T-Helferzellen *in vitro* und in CD4+ Zellen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass (1.) IFN- γ ein Zielgen der miRNA-15b ist. Des Weiteren, dass (2.) *in vitro* eine Hochregulation der miRNA-15b in der Differenzierungsphase von T_H1- und T_H2-Zellen im Vergleich zu T_H0-Zellen stattfindet, im Unterschied zu den miRNA-Arrays, die Ausgangspunkt dieser Arbeit waren, jedoch (3.) keine Unterschiede in der Expression *in vitro* zwischen T_H1- und T_H2-Zellen nachweisbar sind. Außerdem konnte demonstriert werden, dass (4.) eine Transfektion von anti-miRNA-15b *in vitro* nur einen geringen, statistisch nicht signifikanten Effekt auf die Expression von IFN- γ -mRNA zeigt, (5.) in *ex vivo* isolierten T-Helferzellen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge jedoch zu einer vermehrten Expression von IFN- γ -mRNA führt. Methodisch konnte (6.) die Lipofektion mit HiPerFect als Alternative für die Transfektion von murinen T-Helferzellen aufgezeigt werden.

4.1 MicroRNA-Expressions-Arrays als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen

miRNA-Arrays bieten die Möglichkeit, das komplette miRNA-Expressionsmuster einer Zelle im physiologischen und pathologischen Zustand darzustellen und eventuelle Unterschiede aufzudecken. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass mithilfe eines Versuchs gleichzeitig über eine Vielzahl von miRNAs schnell und effizient Daten gewonnen werden können. Nach Analyse der Daten kommen in sogenannten *Heatmaps* die Unterschiede in der relativen Expression hunderter miRNAs anschaulich zur Darstellung. Diese Technik eignet sich somit als ideales Einstiegsexperiment um interessante miRNAs für weitere Folgeexperimente zu identifizieren oder um in Kombination mit Genexpressionsanalysen einer Gewebeart interessante miRNA/mRNA-Partner für weitere Untersuchungen herauszufiltern. Letzteres war auch Grundlage dieser Arbeit. Ein nicht zu vernachlässigender Nachteil von

miRNA-Array-Daten liegt dabei in der begrenzten Aussagekraft über die tatsächliche physiologische Relevanz einer miRNA. Neben der daraus folgenden notwendigen Validierung solcher Ergebnisse, bedarf es einer weiteren Untersuchung der Effektorfunktion der fraglichen miRNAs in Einzelexperimenten. Die Real-Time PCR eignet sich als Methode zur weiteren Bearbeitung von miRNA-Array-Daten aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität im besonderen Maße und wird infolgedessen von vielen Autoren als Methode der Wahl verwendet (Chen et al. 2009; Mestdagh et al. 2008; Pritchard et al. 2012). Eventuelle beobachtete variierende Korrelationen zwischen den Ergebnissen der miRNA-Arrays und der Real-Time PCR (Git et al. 2010; Chen et al. 2009; Zubakov et al. 2010) sollten hier wiederum als Anlass für eine kritische Auseinandersetzung mit den gewonnenen Daten eines miRNA-Arrays genutzt werden.

4.2 Die Expression der microRNA-15b während der *in vitro* Differenzierung von T-Helferzellen

Die linienspezifische Differenzierung von T_H0 - zu T_H1 - und T_H2 -Zellen unterliegt zahlreichen komplexen Regulationsmechanismen. Als wichtigste Einflussfaktoren gelten hierbei die Stimulation durch die linienspezifischen Zytokine (IFN- γ , IL-4, IL-5, sowie IL-13) und die Transkriptionsfaktoren T-bet (T_H1 -Zellen) und GATA3 (T_H2 -Zellen), welche als Master-Regulator-Gene die Genexpression der zwei Subtypen steuern (O'Shea und Paul 2010; Zhang et al. 2014b). Neue Forschungsergebnisse konnten jedoch zeigen, dass auch epigenetische Regulationsmechanismen und v.a. miRNAs eine entscheidene Rolle in der Differenzierung von T-Helferzellen zu spielen scheinen (Baumjohann und Ansel 2013; Jeker und Bluestone 2013). miRNA-defiziente T-Zellen zeigten nach Deletionen von *dicer* und *drosha* und somit gestörter miRNA-Biogenese eine vermehrte Differenzierung zu T_H1 -Zellen und eine erhöhte IFN- γ -Produktion (Baumjohann und Ansel 2013). Die Autoren äußerten darauf basierend die Theorie, dass miRNAs v.a. in der Erhaltung des T_H0 -Zellstatus eine wichtige Rolle spielen könnten. Aber auch einzelne miRNAs scheinen spezifischere Effekte auf die Differenzierung von T-Helferzellen zu haben. So spielt die miRNA-29 eine negative Rolle in der Differenzierung von T_H1 -Zellen, indem sie die mRNAs von T-bet und Eomes, Transkriptionsfaktoren für IFN- γ , bindet und somit die Produktion von IFN- γ herunterreguliert (Smith et al. 2012; Steiner et al. 2011). Die miRNA-155

hingegen scheint eine vermehrte Differenzierung zu T_H1-Zellen zu unterstützen, während ihre Abwesenheit eine Polarisation zu T_H2-Zellen zu verursachen scheint (Banerjee et al. 2010). Ein weiteres Beispiel für den komplexen Einfluss von miRNAs auf die Differenzierung von T-Helferzellen ist die miRNA-21, welche einerseits über die Herunterregulation der Produktion von IL-12 in DC, als wichtiger Stimulator der T-bet und IFN- γ -Produktion in T_H1-Zellen, einen negativen Einfluss auf die Differenzierung von T_H1-Zellen ausübt (Lu et al. 2009) und zusätzlich bei Überexpression eine vermehrte GATA3 Expression und T_H2-Polarisation bewirkt (Sawant et al. 2013).

Über die Expression der miRNA-15b in T-Zellen ist bisher wenig bekannt. In CD8+ Zellen, v.a. in naiven CD8+ Zellen, gehört die miRNA-15/16 Familie zu den am stärksten exprimierten miRNAs (Wu et al. 2007). Sommers et al. konnten zeigen, dass die miRNA-15b ebenfalls zu den am höchsten exprimierten miRNAs in CD4+ Zellen zählt (2013). Über die Expression der miRNA-15b in T-Helferzellen gibt es jedoch bisher noch wenig Forschungsergebnisse. Die als Ausgangspunkt der Fragestellung dienenden miRNA-Arrays untersuchten die miRNA- und mRNA-Expressionsprofile von murinen T-Helferzellen der akut allergisch entzündeten Lunge (T_H1- und T_H2-Zellen) und fanden dabei eine vermehrte Expression der miRNA-15b in T_H2-Zellen. Diese Expressionsunterschiede sind in der vorliegenden Arbeit nun unter dem Aspekt, dass miRNAs bereits in der Differenzierungsphase von T-Helferzellen eine essentielle Rolle zu spielen scheinen, *in vitro* weiter untersucht worden. Handlungsleitend war bei dabei die Fragestellung, ob das Ungleichgewicht in der Expression der miRNA-15b zugunsten von T_H2-Zellen auch *in vitro* und bereits während der Differenzierung vorherrscht.

Im Laufe der Untersuchung zeigte sich bei allen untersuchten Zeitpunkten eine erhöhte Expression der miRNA-15b während der Differenzierungsphase beider Subtypen im Vergleich zu naiven T-Helferzellen (Ausnahme T_H2 Tag 1). Über den Zeitraum der Differenzierung konnte eine Zunahme der Expression von Tag 1 bis Tag 6 in beiden Subtypen gezeigt werden. Im Vergleich der Expression der miRNA-15b zwischen T_H1- und T_H2-Zellen war jedoch ein anderes Ergebnis als in den miRNA-Arrays zu sehen, ein Unterschied oder eine vermehrte Expression in T_H2-Zellen war *in vitro* nicht zu finden. Die Expression lag in beiden Subtypen auf einem ähnlichen Niveau.

Eine Erklärung hierfür könnte die artifizielle *in vitro* Umgebung sein, welche die multifaktoriellen Expressionsbedingungen einer miRNA *in vivo* nicht abzubilden vermag. Ein denkbarer Erklärungsansatz wäre jedoch auch, dass die miRNA-15b auf die Expression von IFN- γ sowohl in T_H1- als auch in T_H2-Zellen Einfluss nimmt, ein Ungleichgewicht aber erst im entzündlichen Mikromileu des allergischen AB entsteht und voll zum Tragen kommt. Hierfür würde auch das später diskutierte Ergebnis sprechen, dass die Expression von IFN- γ *in vitro* nur tendentiell durch die Transfektion mit miRNA-15b und anti-miRNA-15b beeinflusst wird, bei *ex vivo* isolierten T-Helferzellen aus dem Modell der akut allergisch entzündeten Lunge jedoch im gleichen Versuchsaufbau eine vermehrte Expression dieser nach Inhibition mit anti-miRNA-15b gezeigt werden konnte. Ein weiteres interessantes Folgeexperiment zur Untersuchung dieses Themenkomplexes wäre somit, die miRNA-15b während der Differenzierungsphase von T_H1- und T_H2-Zellen mittels Transfektion von anti-miRNA-15b zu inhibieren und den Einfluss auf die Differenzierung und Produktion von IFN- γ mittels Real-Time PCR zu untersuchen.

4.3 *In silico* Suche von microRNA-Zielgenen

Nach Auswahl einer oder mehrerer miRNAs zur weiteren Untersuchung erweist sich die Erforschung von miRNA/mRNA-Interaktionen mit experimentellen Methoden aufgrund der schier unüberschaubaren Menge an möglichen Kombinationen in der Praxis häufig als schwierig. Hochdurchsatzverfahren zur Zielgenbestätigung fehlen bisher, ein vielgenutzter Ansatz zur Untersuchung von potentiellen Zielgenen von miRNAs ist die Suche anhand von computergestützten Algorithmen. Potentielle Websites, die miRNA-Zielgene anhand unterschiedlicher Kriterien vorhersagen, sind z.B. *Pictar* (pictar.mdc-berlin.de/), *TargetScan* (www.targetscan.org/) oder *miRanda* (www.microrna.org). Grundlage dieser digitalen Algorithmen ist dabei häufig die Suche nach zu den *Seed*-Sequenzen der untersuchten miRNAs komplementären Sequenzen in 3'-UTR anhand von Genomdatenbanken. Je nach Website und mathematischem Modell werden dabei unterschiedliche Wichtungen für den Grad der Komplementarität oder Konservierung der *Seed*- und Zielsequenz vergeben, verschiedene Positionen für *Seed*-Sequenzen verwendet und bewertet sowie zusätzliche Kriterien wie Interspezies-Vergleiche zur Errechnung der Wahrscheinlichkeit der potentiellen

Paarung mit einbezogen (Liu et al. 2014; Zhang und Verbeek 2010; Peterson et al. 2014). Da die verwendeten Algorithmen zur Zielgenvorhersage sich in Anzahl der verwendeten Kriterien und mathematischer Gewichtung unterscheiden, unterscheiden sich die Ergebnisse der unterschiedlichen Suchalgorithmen häufig auch in der Menge der gefundenen Zielgene und Bindungspartner. Ein großer Nachteil der Zielgenvorhersage ist somit die weiterhin bestehende Diskrepanz zwischen einzelnen Algorithmen und die hohen falsch-positiven Raten bei gleichzeitig übersehenen Zielgenen durch den Ausschluss nicht-konservierter Sequenzen oder partieller *Seed*-Sequenzpaarung (Thomas et al. 2010). Da auch als schwach kategorisierte Bindungen oder unkonservierte Bindungsstellen physiologische Relevanz besitzen können, sollte sich bei der Suche nicht nur auf einen Anbieter verlassen werden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde deshalb eine Zielgenanalyse mithilfe der Meta-Datenbank *miRecords* (miRecords; Xiao et al. 2009) vorgenommen, welche einige² der bekanntesten Anbieter von Zielgenanalysen vereint. Wichtig ist festzuhalten, dass eine eindeutige Vorhersage von Zielgenen bisher letztlich noch mit keinem der Algorithmen möglich ist. Auch die schiere Anzahl an potentiellen Zielgenen, die, je nach Einstellung der Suchkriterien, bis in die Tausende gehen kann, macht weitere Überlegungen notwendig. Günstig ist es deswegen, eine zusätzliche Herangehensweise zur Vorauswahl bei der Suche nach potentiellen Zielgenen zu benutzen. Eine solche war auch im Rahmen der Vorarbeit dieser Dissertation gewählt worden: Handlungsleitend war dabei die Überlegung gewesen, dass eine hohe miRNA-Konzentration ursächlich sein kann für eine verminderte Genexpression. Daraufhin war in den vorbeschriebenen miRNA- und mRNA-Arrays gezielt nach miRNAs mit mehr als zweifach erhöhter Expression und gleichzeitig nach mRNAs mit mehr als zweifach erniedrigter

² DIANA-microT (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>) (Stand Dezember 2014); Maragkakis et al. 2009)
MicroInspector (<http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/>) (2010)
miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) (Stand Dezember 2014); Betel et al. 2008)
miRTarget2 (<http://mirdb.org/miRDB/>) 2015; Wong und Wang 2015)
miTarget (<http://cbiit.snu.ac.kr/~miTarget/>) (Stand Dezember 2014); Kim et al. 2006)
NBmiRTar (<http://wotan.wistar.upenn.edu/NBmiRTar/>) (Stand Dezember 2014))
PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) 2012)
PITA (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_dyn_data.html) (Stand Dezember 2014)
RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) (Stand Dezember 2014); Rehmsmeier et al. 2004)
TargetScan/TargetScanS (<http://www.targetscan.org/>) 2014; Friedman et al. 2009; Lewis et al. 2005)
RNA22 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/>) (Stand Dezember 2014); Miranda et al. 2006)

Expression gesucht worden. Aus diesem nun deutlich begrenzten Satz an möglichen Kombinationspartnern waren die ausgewählten miRNAs und mRNAs bioinformatisch auf mögliche Interaktionen überprüft worden. Dabei hatte sich die miRNA-15b mit zweifach erhöhter Expression im miRNA-Array in T_H2-Zellen im Vergleich zu T_H1-Zellen gezeigt. Gleichzeitig war IFN- γ als T_H1-linienspezifisches Zytokin mit einer mehr als zweifach erniedrigten Expression in T_H2-Zellen auffällig gewesen. Somit wurde dieses Paar für eine ausführliche gekreuzte Datenbankanalyse ausgewählt.

Konkret wurde also nach möglichen Bindungsstellen der mmu-miR-15b in der 3'-UTR von IFN- γ gesucht. Hier zeigte sich eine positive Vorhersage in vier von neun abgerufenen Datenbanken (*miRanda*, *RNA22*, *RNA Hybrid* und *PITA*) für eine potentielle Bindungsstelle. Die gefundene Sequenz stimmte in den einzelnen Datenbanken überein und bestand aus 8 Basenpaarungen ohne *mismatches* oder *Wobble*-Paarung. Für die Bewertung der Relevanz einer gefundenen möglichen Verbindung können eine Vielzahl von *scores* herangezogen werden, die sich je nach Anbieter unterscheiden. Problematisch hierbei sind die angesetzten *cut-off* Werte, für die es wiederum keine allgemeingültigen Kriterien gibt.

4.4 Validierung von IFN- γ als Zielgen der microRNA-15b

Schlussendlich bleibt eine unmittelbare experimentelle Validierung von Zielgenen weiterhin unerlässlich. Als Methoden hierfür eignen sich Reporterassays, da sie auf einfache Art und Weise die Bindung von miRNA und mRNA, wenn auch wiederum nur indirekt, nachweisen können (Nicolas 2011; Clément et al. 2015). Die gefundene potentielle Interaktion zwischen dem Zielgen IFN- γ und der miRNA-15b wurde dementsprechend in der vorliegenden Arbeit mit der gut etablierten Methode des Luciferase-basierten Reporterassays untersucht, um eine Validierung von IFN- γ als Zielgen der miRNA-15b zu ermöglichen.

Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der normalisierten Luciferaseaktivität, welche eine Bindung der miRNA-15b an die 3'-UTR von IFN- γ widerspiegelt. Auch die deutliche Dosisabhängigkeit dieses Effektes spricht für eine Bestätigung der gefundenen Interaktion. Zur weiteren Untersuchung der gefundenen Ergebnisse wurde in einem Folgeexperiment die *in silico* vorhergesagte Bindungsstelle in dem IFN- γ 3'-

UTR Expressionsplasmid mutiert. Überraschenderweise zeigte sich jedoch nach erfolgreicher Mutation weiterhin eine reduzierte Reporterogenaktivität und somit eine Bindung der miRNA-15b an die nun mutierte Sequenz der 3'-UTR von IFN- γ . Für dieses Ergebnis gibt es unterschiedliche mögliche Erklärungsansätze. Die vorhergesagte Bindungsstelle der miRNA-15b war ein 8-mer ohne *mismatches*, komplementär zur *Seed*-Sequenz der miRNA-15b auf Position 2-9. Die durchgeführte Mutation veränderte jedoch nur fünf der acht Basen (Position 4-8), möglich wäre somit, dass die verbliebene Basenpaarung ausreichend war für eine weiterhin erfolgreiche Bindung der miRNA-15b.

Die genauen Mechanismen der Bindung einer miRNA an ihre Ziel-mRNA sind weiterhin nicht ausreichend geklärt. Die zunächst angenommene Theorie, dass nur die Komplementarität von *Seed*-Sequenz und mRNA-Bindungsstelle über eine miRNA/mRNA-Interaktion bestimmt, wird inzwischen durch zahlreiche neue Forschungsergebnisse relativiert. So scheinen weitere Faktoren, wie der GC-Gehalt um die *Seed*-Sequenz einen Einfluss auf die Bindung einer miRNA an ihr Zielgen zu haben (Wang 2014). Andere Forschungsarbeiten konnten sowohl Bindungsstellen, die sich im 5'-UTR der Ziel-mRNA befinden, als auch sogenannte *seedless targets*, bei der eine miRNA/mRNA-Interaktion ohne eine komplementäre *Seed*-Sequenz stattfindet, nachweisen (Fasanaro et al. 2012; Lal et al. 2009; Zhou und Rigoutsos 2014). Weitere Möglichkeiten der Interaktion sind *centered sites*, Basenpaarungen über 10-12 Basen mit dem mittleren Teil einer miRNA, die zu einer verminderten Proteinexpression führen oder *3' compensatory sites*, bei der eine schwache Paarung der *Seed*-Sequenz am 5'-Ende der miRNA über eine starke Basenpaarung am 3'-Ende der miRNA kompensiert wird (Pasquinelli 2012a; Shin et al. 2010). Viele dieser alternativen Bindungsstellen werden durch die herkömmlichen Zielgenanalysen jedoch nicht erfasst.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die weiterhin bestehende Bindung nach Mutation der vorhergesagten Bindungsstelle ist somit die Existenz weiterer Bindungsstellen in der 3'-UTR von IFN- γ , welche durch die benutzten Algorithmen nicht erfasst wurden. Sullivan et al. konnten in ihren Experimenten in Natürlichen Killerzellen zur Untersuchung des Effektes der miRNA-15/16 Familie auf IFN- γ in Reporterenzymassays folgendes beobachten: nach Mutation der erfolgversprechendsten *in silico* vorhergesagten Bindungsstelle zeigte sich weiterhin eine

Translationsrepression durch die untersuchten miRNAs (miRNA-15a/b, -16-1/-2) (2012). Erst nach Mutation einer zweiten vorhergesagten Bindungsstelle konnte kein Effekt mehr im Reporterenzymassay nachgewiesen werden (2012). Diese zweite Bindungsstelle zeigt keine klassische *Seed*-Basenpaarung, sondern das Muster einer *centered site* (s.o.) mit Basenpaarung im zentralen Bereich der miRNA-15b und wurde von den für diese Dissertation benutzten Algorithmen nicht vorhergesagt. Nach Zusammenschau der Ergebnisse scheint es somit möglich, dass diese zweite Paarung die für die Interaktion relevante Bindung darstellen könnte, was wiederum die Notwendigkeit der umfassenden experimentellen Validierung *in silico* vorhergesagter Interaktionen unterstreicht. Der finale Beweis für diese Theorie läge im Nachweis einer fehlenden Bindung der miRNA-15b im Reportgenassay nach Mutation dieser möglichen zweiten Bindungsstelle.

4.5 Transfektion von primären T-Helferzellen: Die Lipofektion als Alternative zur Nukleofektion

In der vorliegenden Dissertation wurde im nächsten Schritt mittels Transfektion von murinen, primären T-Helferzellen versucht, Einfluss auf die Expression von IFN- γ zu nehmen. Es wurden sowohl *in vitro* differenzierte T_H1- und T_H2-Zellen, als auch *ex vivo* isolierte CD4⁺ Zellen transfiziert.

Primäre T-Zellen gelten generell als schwierig zu transfizieren, da refraktär gegenüber konventionellen Transfektionsreagenzien und der Technik der Elektroporation. Lonza (ehemals Amaxa, Köln, DE) entwickelte basierend auf der Technik der Elektroporation die sogenannte Nucleofection™ (im Folgenden Nukleofektion), die eine Transfektion von bisher als schwer transfizierbar geltenden Zellen – wie beispielsweise primäre T-Zellen – möglich machte (Gresch et al. 2004). Bis dato hatten nur virale Vektoren als Alternative zur Transfektion von primären T-Zellen gegolten, diese sind jedoch kostenintensiv und aufwendig in der Herstellung (Tahvanainen et al. 2006).

Die Technik der Nukleofektion wird seither mit Erfolg für die Transfektion von primären T-Helferzellen verwendet (Freeley und Long 2013a, 2013b; Tahvanainen et al. 2006; Yin et al. 2006). Probleme der Nukleofektion sind dabei u.a. stark erhöhte Zelltodraten und eine verminderte Zellviabilität (Freeley und Long 2013a). Zhang et al.

berichteten darüber hinaus über weitere negative Auswirkungen auf primäre humane T-Zellen: Nach Transfektionen traten Veränderungen der Zellmorphologie sowie erhöhte intrazelluläre Kalzium-Spiegel bis acht Stunden nach Transfektion auf, was auf länger persistierende Schäden in den Zellmembranen nach Transfektion hinweisen könnte (2014a). Kalzium ist als sekundärer Botenstoff an einer Vielzahl von Signalwegen in T-Helferzellen beteiligt, eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums über *calcium-release-activated calcium channels* (CRAC) ist z.B. essentiell für die Aktivierung, Proliferation und Zytokinproduktion von T-Helferzellen, eine artifizielle Erhöhung könnte somit zu einer Veränderung des Aktivierungsstatus der transfizierten Zellen führen (Feske 2007). Zhang et al. konnten zudem Veränderungen der Expression von T-Zellaktivierungs-Markern wie CD69 zusammen mit einer insgesamt erhöhten Transkriptionsaktivität nach Nukleofektion beobachten (Zhang et al. 2014a). Auch mit optimierten Transfektionsprotokollen liegen die erreichten Transfektionseffizienzen in der Literatur weiterhin unter 50 % (Tahvanainen et al. 2006; Torgerson et al. 2009). Freeley und Long erreichten mit den für primäre T-Zellen empfohlenen Programmen und siRNA-Mengen unter 300 nM nur eine Transfektionseffizienz von knapp 20 % (2013b). Mit einer Vervielfachung der eingesetzten siRNA-Menge konnten die Autoren hohe Transfektionseffizienzen (*mean transfected cells 68 %*) erreichen, jedoch mit hohen Verlusten in der Zellviabilität (*mean viable cells 36%*). Vergleichbare Transfektionseffizienzen mit jedoch verbesserten Zellviabilitätswerten erreichten die Autoren nur mit einer zweizeitigen *two-hit nucleofection*.

Gegen lipidbasierte Transfektionsreagenzien gelten primäre T-Zellen bisher allgemein als refraktär. Freeley und Long postulieren jedoch, dass diese Überzeugung größtenteils durch Schwierigkeiten mit der Transfektion von DNA in T-Zellen entstanden ist, für die Transfektion von siRNA jedoch nur eingeschränkt gelte (2013a). Zum Beleg zitieren die Autoren mehrere Studien, welche eine gelungene Transfektion mit lipidbasierten Transfektionsreagenzien wie siPORT™, HiPerFect oder Lipofectamine® 2000 berichteten (Ketroussi et al. 2011; Sun et al. 2012; Dinesh et al. 2011).

Zu Beginn dieser Dissertation erfolgte angesichts des Problems der Auswahl einer geeigneten Transfektionsmethode zunächst ein Vergleich von drei ausgewählten Methoden: Die lipidbasierten Reagenzien HiPerFect und siPORT™ sowie die in der Literatur am häufigsten vertretene Methode der Nukleofektion von Lonza sollten hierzu

miteinander verglichen werden. Hierbei zeigte sich bei insgesamt erwartungsgemäß schlechter Transfizierbarkeit der Zellen überraschenderweise ein insgesamt gutes Abschneiden des Transfektionsreagenzes HiPerFect (*Kapitel 3.3.1.*)

Laut Herstellerangaben lässt sich mit der Nukleofektionstechnik von Lonza bei aus Balb/c Mäusen isolierten T-Helferzellen nach 24 h eine mittlere Transfektionseffizienz von 40 % bei einer Zellviabilität von 30 % erreichen. Diese Daten konnten mit einer erreichten Transfektionseffizienz von 41,1 % (nach bereits 4 h) bestätigt werden. Jedoch handelt es sich bei dieser Kontrolle um eine Transfektion mit DNA, dem herstellereigenen Plasmid pmaxGFP®, welches für das grün-fluoreszierende Protein maxGFP™ kodiert. Die durch die Transfektion mit markierter siRNA ermittelte Transfektionseffizienz lag lediglich bei 4 % transfizierten Zellen. Warum sich hier eine so große Diskrepanz zeigte, ist nicht vollständig klar. Laut Herstellerangaben werden mit dieser Methode deutlich höhere Mengen an siRNA benötigt um die reale Transfektionseffizienz zu erreichen, weshalb die Transfektionseffizienz mit dem oben genannten Plasmid bestimmt werden soll. Die so ermittelte Transfektionseffizienz ist laut Hersteller ebenfalls für die Transfektion mit siRNA übertragbar.

Das Reagenz siPORT™ zeigte sich den beiden anderen Methoden mit einer maximalen Transfektionseffizienz von 14,4 % deutlich unterlegen und eignet sich demnach nicht für die Transfektion von T-Helferzellen aus Balb/cMäusen. Das Transfektionsreagenz HiPerFect hingegen zeigte eine Transfektionseffizienz von 33,1 % bei geringem Zelltod (97,1 % control vs. 94,7 % transfected) und konnte somit als gute Alternative zur Nukleofektion, welche bei zwar höherer Transfektionseffizienz auch eine höhere Rate an toten Zellen nach Transfektion aufwies, bestätigt werden. Weitere Nachteile der Nukleofektion sind hohe Kosten in der Anschaffung der benötigten Materialien, welche bei der Anwendung „einfacher“ Transfektionsreagenzien entfallen. Aus diesen Gründen wurde die Entscheidung für das Reagenz HiPerFect getroffen.

Jedoch ergeben sich auch mit der Lipofektion einige Probleme, die bedacht werden müssen. Die transfizierte miRNA wird in Vesikeln von den Zielzellen aufgenommen, dabei muss davon ausgegangen werden, dass ein Teil der transfizierten miRNAs in diesen Vesikeln verbleibt und somit biologisch inaktiv ist. Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Bestimmung der Transfektionseffizienz mit fluoreszenz-markierter siRNA.

Mit der Durchflusszytometrie ist der Untersucher nicht in der Lage festzustellen, ob sich die transfizierte miRNA tatsächlich im Zytosol der Zielzellen befindet. Auch Vesikel, die nicht durch Endozytose aufgenommen werden, und an den Zellmembranen kleben, werden als transfizierte Zellen registriert. Um die tatsächliche Lokalisation der transfizierten siRNA zu bestimmen, könnten Auswertungen mittels konfokaler Laser-Mikroskopie weiterhelfen. Um sicher zu stellen, dass die transfizierten miRNAs im Zytosol der Zielzellen landen, wurden in dieser Dissertation zusätzlich zu der vorher ermittelten Transfektionseffizienz (vor Auswertung der IFN- γ -Expression in den Zielzellen) die miRNA-Expression nach Transfektion im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle bestimmt. Hierbei zeigte sich bei viermaliger Transfektion trotz jeweils gleicher verwendeter miRNA-Menge eine große Spannweite in der relativen miRNA-Expression 24 h nach Transfektion. Diese Spanne lag zwischen einem 200-fachen und 2000-fachen *mean fold change* der miRNA-15b im Vergleich zur nichttransfizierten Kontrolle. Dies liegt zwar deutlich über der untransfizierten Kontrolle, sodass von einem Erfolg der Transfektion ausgegangen werden kann, jedoch unterlag sie offensichtlich deutlichen Schwankungen. Zur Erklärung dieser Varianz könnte man Unterschiede in der Effizienz der Reverse-Transkriptase- Reaktionen oder der Real-Time PCR annehmen, solche signifikanten Unterschiede erscheinen angesichts der Datenlage für die hohe Reproduzierbarkeit der Taqman microRNA Real-Time PCR-Arrays aber als eher unwahrscheinlich (Chen et al. 2009). Vielmehr muss auch hier davon ausgegangen werden, dass die Transfektion von T-Helferzellen mit einem gewissen Mangel an Effizienz behaftet ist und, dass diese Unsicherheit ausschlaggebend auch für diese beobachteten Varianzen ist.

Wie in den vorherigen Abschnitten ausgeführt, bringt die Transfektion von primären T-Helferzellen einige inhärente Probleme mit sich, darunter niedrige Transfektionseffizienzen und ein Verlust an Zellviabilität. Diese Probleme beeinflussen naturgemäß auch die Evaluation der erzielten Ergebnisse, da bei einer niedrigen Transfektionseffizienz Negativergebnisse stets mit der Unsicherheit der mangelnden Methodeneffektivität belastet sind. Das ausgewählte Transfektionsreagenz HiPerFect brachte zwar angesichts der erwartbar niedrigen Transfektionseffizienz ein gutes Gesamtergebnis, nichtsdestotrotz blieb immer noch eine hohe Anzahl von Zellen untransfiziert. Die erzielte Transfektionseffizienz liegt weiterhin in einem Bereich, in

dem mögliche miRNA/mRNA-Interaktionen mit schwacher Auswirkung übersehen werden können.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse dieser Dissertation aufzeigen, dass die Lipofektion mit HiPerFect als Transfektionsmethode für siRNAs in murine, primäre T-Zellen aus Balb/c Mäusen eine attraktive Alternative zu der weitaus häufiger verwendeten Methode der Nukleofektion darstellt. Darüberhinaus erscheint eine weitere Optimierung der Transfektionseffizienz, v.a. im Bezug auf die eingesetzte siRNA-Menge ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Versuche.

4.6 Untersuchung der Effektorfunktion einer microRNA

Nach Validierung einer miRNA/mRNA-Interaktion gilt es, deren physiologischen Einfluss zu untersuchen. Eine miRNA kann einerseits bis zu Hunderte von Zielgenen mit dabei jeweils sehr unterschiedlicher Einflussstärke regulieren. Andererseits unterliegen einzelne mRNAs der Regulation durch mehrere miRNAs (Ho, J J David und Marsden 2014). Von dem Effekt einer miRNA im Reporterassay auf ihre tatsächliche physiologische Relevanz zu schließen, ist nicht möglich. Dieser bestätigt lediglich eine *in silico* vorhergesagte Bindung zwischen miRNA und dem 3'-UTR des Zielgens. Zur Überprüfung des Einflusses dieser Bindung bieten sich Transfektionsversuche mit miRNA Mimics und Antagomirs mit anschließender Untersuchung der mRNA- und Proteinexpression des zu untersuchenden Zielgens an (Stenvang et al. 2012). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass durch eine Transfektion supraphysiologische Konzentrationen von miRNA und miRNA-Inhibitor erreicht werden, welche so *in vivo* nicht in den Zielzellen vorherrschen. Dieser Nachteil lässt sich jedoch dahingehend relativieren, dass die Erforschung von miRNAs und ihren Inhibitoren ja grundsätzlich auch auf die Suche nach Anwendungsmöglichkeiten (sprich: Therapeutika) hin ausgelegt ist; in diesem Falle konkret auf die Suche nach einem Molekül, welches die T_H2-Zell-Dominanz beim allergischen AB reduzieren könnte. MiRNAs oder ihre Inhibitoren als potentielle Medikamente würden in solch einem therapeutischen Szenario natürlich ebenfalls in supraphysiologischen Konzentrationen verabreicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von IFN- γ in T-Helferzellen mithilfe von Transfektionsversuchen untersucht, um mehr Informationen über den Einfluss der miRNA-15b auf ihr Zielgen IFN- γ im physiologischen und im pathologischen Zustand AB zu sammeln.

Als Ergebniss zeigten sich auf *in vitro*-Ebene, ohne den Einfluss des entzündlichen Milieus, nur geringfügige, statistisch nicht signifikante Veränderungen der IFN- γ -Expression nach Transfektion mit miRNA-Mimic oder Antagomir. Zusätzlich wurden die Versuche auf *ex vivo*-Ebene mit aus Balb/c Mäusen isolierten T-Helferzellen aus dem Modell der akut allergisch entzündeten Lunge wiederholt. Auch hier erbrachte die Transfektion mit miRNA-15b keine Reduktion der Proteinexpression von IFN- γ . Die Transfektion mit anti-miRNA-15b zeigte hingegen eine signifikante Erhöhung der IFN- γ mRNA-Expression, diese manifestierte sich wiederum aber nicht in einer erhöhten Proteinkonzentration von IFN- γ im Zellkulturmedium. Zur Einordnung und Interpretation dieser Ergebnisse bedarf es einiger weiterer Überlegungen.

MiRNAs üben in der Mehrzahl der Fälle einen inhibitorischen Effekt auf ihre Ziel-mRNA aus. Wenn nun per Transfektion weitere Mengen derselben miRNA transfiziert werden, besteht die Möglichkeit, dass potentielle Effekte übersehen werden, da das Maximum der Inhibierung bereits erreicht und eine Applikation von weiteren miRNA-Molekülen keinen Effekt mehr auszuüben vermag. Daher empfiehlt es sich, so wie in dieser Dissertation auch geschehen, gleichzeitig Transfektionsversuche mit der korrespondierenden anti-miRNA durchzuführen, um eine mögliche bestehende Inhibierung durch die zu untersuchende miRNA aufzuheben.

Dies könnte die Diskrepanz zwischen miRNA- und anti-miRNA-Wirkung in den Versuchen erklären. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass die im Reporterassay benutzte, leicht verkürzte 3'-UTR von IFN- γ zu einer veränderten Tertiärstruktur führt, welche es dem miRISC erleichtert im Reporterassay an die Zielsequenz zu binden, diese Bindung im kompletten Protein jedoch eingeschränkt oder nicht möglich ist. Hiergegen spricht jedoch wiederum, dass nach Applikation von anti-miRNA-15b eine erhöhte IFN- γ -mRNA-Expression auftrat, was für eine bestehende Regulation durch die miRNA-15b spricht, welche durch die Transfektion der Antagomir vermindert wurde.

Ein weiteres Problem stellt die teilweise noch unklare Wirkungsweise und variierende Potenz von miRNA-Inhibitoren dar (Stenvang et al. 2012; Lennox und Behlke 2010). Im ersten Teil der Arbeit konnte der Effekt der miRNA-15b durch gleiche Konzentrationen an Effektor und Inhibitor nicht aufgehoben werden. Als Konsequenz daraus erfolgte die Transfektion der anti-miRNA-15b in den weiteren Transfektionsversuchen in doppelter Menge in Relation zur miRNA-15b. Eine wichtige Frage in der Betrachtung dieser Ergebnisse ist somit, ob die erzielten Teilerfolge durch eine Optimierung sowohl auf Seite der Transfektionseffizienz (siehe *Kapitel 4.5*) als auch auf Seite der eingesetzten Menge von miRNA und anti-miRNA gesteigert werden könnten oder ob diese Teilerfolge einer weiteren Optimierung nicht zugänglich sind.

Ein wesentlicher Aspekt in der Diskussion der Ergebnisse sind auch die Unterschiede der Effekte auf *in vitro*- und *ex vivo*-Ebene. Wie bereits ausgeführt, hatten die im Vorfeld dieser Dissertation durchgeführten miRNA-Arrays signifikante Unterschiede in der Expression der miRNA-15b zwischen T_H1- und T_H2-Zellen im murinen Modell der akuten Atemwegsentzündung gefunden. Diese Unterschiede in der Expression konnten in *in vitro* differenzierten T-Helferzellen nicht nachvollzogen werden. Auch die Transfektionsversuche auf *in vitro*-Ebene konnten nur geringe, nicht signifikante Unterschiede in der Expression von IFN- γ nach Transfektion nachweisen. Daher liegt der Schluss nahe, dass der Effekt der miRNA-15b auf die Expression von IFN- γ erst im entzündlichen Milieu des allergischen AB voll zum Tragen kommt. Eine weitere Möglichkeit ist darüber hinaus natürlich auch, dass die artifiziellen *in vitro* Bedingungen der Versuche nur eine unzureichende Abbildung der *in vivo* Situation darstellen. Dementsprechend erfolgten weitere Transfektionsversuche mit *ex vivo* isolierten CD4+-Zellen aus dem Modell der akut allergisch entzündeten Lunge. Hier konnte eine signifikant erhöhte IFN- γ -mRNA-Expression in der Real-Time PCR nach Transfektion mit anti-miRNA-15b nachgewiesen werden. Eine mögliche Interpretation der Daten wäre somit, dass die miRNA-15b einen messbaren regulatorischen Effekt auf IFN- γ erst im entzündlichen Mikromilieu des allergischen AB entfaltet und somit auch erst hier der inhibitorische Effekt der anti-miRNA-15b wirksam werden kann.

Weiterhin diskussionswürdig angesichts der Ergebnisse ist die Frage, warum die beobachtete erhöhte Expression der IFN- γ -mRNA nicht zu einer erhöhten IFN- γ -Konzentration im Zellkulturmedium führte. Hier muss zum einen bedacht

werden, dass mRNA- und Proteinexpression nicht zwangsläufig miteinander korrelieren (de Sousa Abreu, Raquel et al. 2009; Vogel und Marcotte 2012). Außerdem muss angemerkt werden, dass mit der gewählten Methode der IFN- γ -Konzentrationsbestimmung im Zellkulturmedium lediglich das von den Zellen sezernierte Protein gemessen wird. Eine nur moderate Änderung der mRNA-Expression muss sich nicht zwangsläufig in einer deutlich erniedrigten Proteinabgabe in das umliegende Medium niederschlagen. Weiterführende Experimente könnten somit die Messung der intrazellulären IFN- γ Konzentration nach Transfektion mit anti-miRNA-15b mittels Durchflusszytometrie oder ähnlichen Methoden zum Untersuchungsgegenstand haben.

Der Bereich der Epigenetik und insbesondere die Regulation der Genomexpression einer Zelle durch ihr distinktes miRNA-Expressionsmuster wirft weiterhin viele Fragen auf. Besonders aufgrund der Tatsache der Mehrfachregulierungen fällt es schwer, an der Änderung einer singulären miRNA-Konzentration einen linearen Bezug zur Expression eines Zielgens festzumachen. So führte die Blockierung der miRNA-15b in den vorliegenden Versuchen zwar zu einer erhöhten mRNA-Expression von IFN- γ , die Proteinkonzentration jedoch blieb unverändert. Zusätzlich zu den bereits angeführten methodischen Überlegungen muss hier also die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die miRNA-15b nur eine schwache regulatorische Potenz aufweist oder, dass die IFN- γ -mRNA nach Hochregulation durch die experimentellen Eingriffe kompensatorisch – eventuell durch andere miRNAs - gegenläufig reguliert wurde. Hierfür sprechen auch einige weitere Forschungsergebnisse, die zeigen konnten, dass einzelne miRNAs häufig nur einen sehr geringen Effekt auf den tatsächlichen Protein *output* einer Zelle haben (Baek et al. 2008; Selbach et al. 2008; Hoffman und Pilpel 2015). In vielen Fällen scheinen miRNAs nur einen feinregulatorischen oder dämpfenden Einfluss auf ihre Zielproteine auszuüben, was auch im Falle der miRNA-15b denkbar wäre.

4.7 Die microRNA-15b

Die miRNA-15b entstammt dem miRNA-15/16 Cluster, welcher außerdem noch die miRNA-15a, miRNA-16-1/-2, miRNA-195 und miRNA-497 enthält. Der miRNA-15/16 Cluster wurde bisher vor allem in seiner Funktion als Tumorsuppressor erforscht.

Zielgene sind u.a. die Onkogene BCL2 und das am Zellzyklus beteiligte Cyclin D1. Bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (B-Zelllymphom) liegt die am häufigsten vertretene Genmutation (Deletion 13q14) im Genlokus des Clusters und führt zu einer verminderten oder fehlenden Expression des miRNA-15/16 Clusters bei konkordant erhöhter Expression von BCL2 (Pekarsky und Croce 2014). Auch die miRNA-15b scheint eine Funktion im Bereich der Regulation der Zellproliferation zu haben. So fanden Xia et al. (2009) heraus, dass die miRNA-15b über das target Cyclin E1 den Zellzyklus in Gliomzellen reguliert. Auch eine Funktion als Tumorsuppressor scheint möglich, nachdem gezeigt werden konnte, dass hohe Level der miRNA-15b invers mit der Rezidivwahrscheinlichkeit beim Hepatozellulären Karzinom (HCC) korrelieren (Chung et al. 2010). Über das Zielgen bcl-w hemmt die miRNA-15b dabei anscheinend die Proliferation von HCC-Zellen und fördert deren Apoptose.

Während über die Expression des miRNA-15/16-Clusters in B-Zellen in den letzten Jahren bereits einige Daten gesammelt werden konnten (s.o.), ist über die Funktion der miRNA-15b in T-Zellen noch wenig bekannt. Einige zusätzliche Erkenntnisse über die Funktion der miRNA-15b in T-Zellen konnten nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnen werden. Zum einen gelang es, mittels Reporterassay IFN- γ als Zielgen der miRNA-15b zu bestätigen. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass durch die Inhibierung der miRNA-15b in differenzierten T-Helferzellen der akut allergisch entzündeten Lunge eine erhöhte Expression von IFN- γ auf mRNA-Ebene erreicht wird. Auch eine insgesamt erhöhte Expression der miRNA-15b in T_H1- und T_H2-Zellen im Vergleich zu naiven T-Helferzellen konnte gezeigt werden.

Eine durchgeführte Literaturrecherche zu der Verknüpfung von miRNA-15b mit IFN- γ ergab nur eine äußerst spärliche Anzahl an Publikationen, was zunächst einmal für den Forschungsbedarf in diesem Bereich spricht. Die veröffentlichten Publikationen kommen darüber hinaus zu vergleichbaren Erkenntnissen wie diese Arbeit: So konnten Zhong et al. (2013), nachdem sie in ihren Experimenten eine erhöhte Expression der miRNA-15b in CD8⁺ T-Zellen gefunden hatten, nachweisen, dass sich bei weiterer Applikation der miRNA-15b in Transfektionsversuchen eine verminderte IFN- γ -Expression in den untersuchten Zellen zeigte (2013). Eine darüber hinausgehende direkte Validierung von IFN- γ als Zielgen der miRNA-15b, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, führten die Autoren jedoch nicht durch. Eine weitere Arbeit, die sich

mit der Funktion der miRNA-15/16 Familie und ihrer Funktion in Zellen des Immunsystems befasst, ist die Publikation von Sullivan et al. (2012). Die Autoren beobachteten eine erhöhte Expression von IFN- γ in Dicer1-defizienten murinen Natürlichen Killerzellen, die aufgrund des für die miRNA-Biogenese essentiellen Enzymdefektes verringerte miRNA-Level aufwiesen. Die Forscher konnten daraufhin den Verlust der miRNA-15a/15b/16 Familie als potentielle Ursache für die erhöhte IFN- γ -Expression ausmachen, ein Zusammenhang, der mithilfe von Reporterassays für IFN- γ als Zielgen der miRNA-15b bestätigt wurde. Auch diese Arbeit unterstützt demnach die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das allergische Asthma bronchiale zeichnet sich durch eine von T-Helferzellen gesteuerte, komplexe und bis heute nicht vollständig verstandene chronische Entzündungsreaktion aus. Auch wenn im Rahmen des Krankheitsbildes zunehmend von einer Heterogenität und Plastizität der T-Helferzellen insgesamt ausgegangen wird, so nimmt die Gruppe der T_H2-Zellen im Speziellen weiterhin eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Erkrankung ein. Mit ihrer charakteristischen Zytokinproduktion unterhalten sie die lokale Immunreaktion des respiratorischen Epithels und führen so zum typischen *remodeling* der Atemwege.

Die Neigung des Immunsystems nach Allergenkontakt eine T_H2-dominierte Reaktion auszubilden, wird unter anderem auf epigenetische und posttranskriptionelle Regulationsmechanismen zurückgeführt. Die genauen Umstände, die zur Ausbildung dieses Ungleichgewichts zwischen T_H1- und T_H2-Zellen in der Immunantwort führen, sind jedoch noch in weiten Bereichen ungeklärt. Ein wesentlicher Teil der posttranskriptionellen Regulation einer Zelle oder eines Gewebes wird durch ihr miRNA-Expressionsmuster gesteuert. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass miRNAs auch im Bereich der Differenzierung, Heterogenität und Ausübung von Effektorfunktionen der Zellen des Immunsystems eine wichtige Rolle spielen.

In miRNA-Arrays von murinen T-Helferzellen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge konnte eine erhöhte Expression der miRNA-15b in T_H2-Zellen im Vergleich zu T_H1- und naiven T-Helferzellen nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde in der vorliegenden Arbeit die Fragestellung untersucht, ob Expressionsunterschiede der miRNA-15b Einfluss auf die Entwicklung der T_H2-dominanten Entzündungsreaktion beim allergischen Asthma bronchiale haben. Hierfür wurde sowohl die Expression der miRNA-15b *in vitro* während der Differenzierungsphase von T_H1- und T_H2-Zellen als auch der Einfluss der miRNA-15b auf das T_H1-Leitzytokin IFN- γ näher analysiert.

Zunächst konnte IFN- γ *in silico* per Datenbankanalyse und experimentell im Reporterassay als Zielgen der miRNA-15b bestätigt werden. Des Weiteren wurde eine Hochregulation der miRNA-15b in der Differenzierungsphase von T_H1- und

T_H2-Zellen *in vitro* im Vergleich zu naiven T-Helferzellen gezeigt. Eine Hochregulation der miRNA-15b *in vitro* speziell in T_H2-Zellen konnte im Kontrast zu den vorausgegangenen miRNA-Arrays nicht bestätigt werden.

Bezüglich des Einflusses der untersuchten miRNA auf IFN- γ wurde gezeigt, dass eine Transfektion von anti-miRNA-15b auf *in vitro*-Ebene keinen Effekt auf die Expression von IFN- γ -mRNA zeigt, in *ex vivo* isolierten T-Helferzellen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge jedoch zu einer vermehrten Expression der IFN- γ -mRNA führt. Methodisch wurde in dieser Dissertation die Lipofektion mit HiPerFect als Alternative für die Transfektion von T-Helferzellen präsentiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass IFN- γ einer Regulation durch die miRNA-15b unterliegt und seine Expression im Modell des allergischen Asthma bronchiale durch die miRNA-15b beeinflusst wird. Die Arbeit konnte somit ihr Ziel, einen Beitrag zum besseren Verständnis des Einflusses von miRNAs auf die Pathogenese des Asthma bronchiale zu leisten, erfüllen. Die gefundenen Erkenntnisse machen die miRNA-15b zu einem interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen im Forschungsfeld Asthma bronchiale.

6 ABSTRACT

Atopic asthma is a chronic inflammatory disease of the airways. Even though T cell plasticity is becoming more important in the context of atopic asthma, T_H2 cells still count as one of the main contributing factors in the pathophysiology of the disease. With their specific cytokine production, they orchestrate and maintain the chronic respiratory inflammation which can ultimately lead to a remodeling of the airways.

Why it is that atopic individuals react with a T_H2 cell dominated immune response upon allergen contact is still not fully understood, but it is believed to be caused by a combination of genetic, epigenetic, and posttranscriptional regulation. An important part of posttranscriptional regulation is the large group of microRNAs (miRNAs) that was discovered only about twenty years ago. Changes in miRNA expression can have numerous effects on gene expression levels in both physiological and pathological conditions, including differentiation, activation, and key effector functions of immune cells. miRNA expression arrays of T helper cells isolated from lungs of mice with acute asthma phenotype showed higher miRNA-15b levels in T_H2 cells compared to T_H1 and naïve T helper cells. These results demanded further research and are the subject of this dissertation.

The research objective for this thesis was to contribute to a better understanding of the role of miRNA in the pathogenesis of atopic asthma. This was achieved by analyzing the expression of miRNA-15b during the differentiation of T_H1 and T_H2 cells from naïve T helper cells *in vitro*. Furthermore, the influence of the miRNA-15b on the expression of IFN- γ in T helper cells was investigated *in vitro* and in isolated CD4+ cells from mouse models of atopic asthma.

As a result, it could be shown that miRNA-15b is increasingly expressed during T helper cell differentiation compared to naïve T helper cells, but in contrast to the miRNA arrays mentioned above, no difference in expression levels between T_H1 and T_H2 cells was found *in vitro*. In addition to this finding, IFN- γ was shown to be a predicted target of miRNA-15b *in silico* and could be experimentally validated with luciferase reporter assays. Furthermore, it was demonstrated that transfection of anti-miRNA-15b had no effect on IFN- γ expression *in vitro* but increased IFN- γ -mRNA

in *ex vivo* isolated T helper cells from models of acute asthma. Methodically, lipofection with HiPerFect could be presented as an alternative method for transfecting primary T helper cells.

These findings show that miRNA-15b targets IFN- γ and that it seems to have an effect on IFN- γ expression in T helper cells in atopic asthma. This makes it an interesting topic for further research.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
3'-UTR	3'- untranslatierte Region
AB	Asthma bronchiale
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
bp	Basenpaare
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNS
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
GINA	Global Initiative for Asthma
GOI	gene of interest
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
hsa-miR	humane microRNA
i.v.	intravenös
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	kilo-Basenpaar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
miR	microRNA
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmu-miR	murine microRNA
mRNA	messenger RNA
Mut	Mutante
ng	Nanogramm
NKT	Natürliche Killerzelle (natural killer T cell)
nm	Nanometer
oRT	Omniscript Reverse Transkriptase
p.o.	per os
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEF	Spitzenfluss (peak expiratory flow)
pre-miRNA	precursor microRNA
pri-miRNA	primary microRNA
Real-Time (q-)PCR	Real-Time quantitative PCR

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
SEM	Standardfehler
siRNA	small interfering RNA
T _H 0-Zellen	Naive T-Helferzellen
T _H 17-Zellen	T-Helferzellen vom Typ 17
T _H 1-Zellen	T-Helferzellen vom Typ 1
T _H 2-Zellen	T-Helferzellen vom Typ 2
T _H 9-Zellen	T-Helferzellen vom Typ 9
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
WT	Wildtyp

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau des pmirGLO Plasmids	21
Abbildung 2: Markierungsstrategie Durchflusszytometrie.....	32
Abbildung 3: <i>In silico</i> vorhergesagte Bindungsstelle der mmu-miR-15b in der 3'-UTR von IFN- γ	34
Abbildung 4: Reportengenassay miR-15b und IFN- γ 3'-UTR.....	36
Abbildung 5: Reportengenassay miR-15b vs. miR-29a	37
Abbildung 6: Kotransfektion der miR-15b und miR-29a mit ihren korrespondierenden Antagomirs	38
Abbildung 7: Reporterassay Wildtyp (WT) vs. Mutante (Mut)	40
Abbildung 8: Protokoll zur <i>in vitro</i> Differenzierung von T-Helferzellen	43
Abbildung 9: Kinetik der relativen Expression der miR-15b während der Differenzier- ung von T _H 1- und T _H 2-Zellen im Vergleich zu T _H 0-Zellen	45
Abbildung 10: Transfektionseffizienz HiPerFect vs. siPORT TM	49
Abbildung 11: Transfektionseffizienz Amaxa Nucleofection TM	49
Abbildung 12: Vergleich HiPerFect, siPORT TM und Nucleofection TM	51
Abbildung 13: Transfektion von <i>in vitro</i> differenzierten T-Helferzellen	53
Abbildung 14: Transfektion von <i>ex vivo</i> gewonnenen T-Helferzellen aus Modellen der akut allergisch entzündeten Lunge	55

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Transfektionsansätze HiPerFect	20
Tabelle 2: Stimulanzen zur <i>in vitro</i> Differenzierung von naiven T-Helferzellen	25
Tabelle 3: Pipettierschema cDNA Synthese aus mRNA	29
Tabelle 4: Pipettierschema cDNA Synthese aus microRNA	29
Tabelle 5: Pipettier- und Temperaturschema Real-Time PCR messenger RNA	30
Tabelle 6: Pipettier- und Temperaturschemata Real-Time PCR microRNA	31
Tabelle 7: In silico Vorhersage von Bindungsstellen der mmu-miR-15b in der 3'-UTR von IFN-γ	34

Literaturverzeichnis

- Agache, I.; Akdis, C.; Jutel, M.; Virchow, J. C. (2012): Untangling asthma phenotypes and endotypes. In: *Allergy* 67 (7), S. 835–846. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2012.02832.x.
- Albert, Michael; Albrecht, Katinka; Ballmer-Weber, Barbara (2012): *Klinische Immunologie*. 3. Aufl. Hg. v. Hans-Hartmut Peter, Werner Pichler und Ulf Müller-Ladner. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Almeida, Maria I.; Reis, Rui M.; Calin, George A. (2011): MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. In: *Mutat. Res.* 717 (1-2), S. 1–8. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009.
- Baek, Daehyun; Villén, Judit; Shin, Chanseok; Camargo, Fernando D.; Gygi, Steven P.; Bartel, David P. (2008): The impact of microRNAs on protein output. In: *Nature* 455 (7209), S. 64–71. DOI: 10.1038/nature07242.
- Banerjee, Arnob; Schambach, Felix; DeJong, Caitlin S.; Hammond, Scott M.; Reiner, Steven L. (2010): Micro-RNA-155 inhibits IFN-gamma signaling in CD4+ T cells. In: *Eur. J. Immunol.* 40 (1), S. 225–231. DOI: 10.1002/eji.200939381.
- Bartel, David P. (2004): MicroRNAs. In: *Cell* 116 (2), S. 281–297. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- Baumjohann, Dirk; Ansel, K. Mark (2013): MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. In: *Nat. Rev. Immunol.* 13 (9), S. 666–678. DOI: 10.1038/nri3494.
- Betel, Doron; Wilson, Manda; Gabow, Aaron; Marks, Debora S.; Sander, Chris (2008): The microRNA.org resource: targets and expression. In: *Nucleic Acids Res.* 36 (Database issue), S. D149-53. DOI: 10.1093/nar/gkm995.
- Boaton, Richard; Lindsay, Mark A. (2014): Emerging role of MicroRNAs and long noncoding RNAs in respiratory disease. In: *Chest* 146 (1), S. 193–204. DOI: 10.1378/chest.13-2736.
- Bradding, Peter; Green, Ruth H. (2010): Subclinical phenotypes of asthma. In: *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 10 (1), S. 54–59. DOI: 10.1097/ACI.0b013e32833489a9.
- Brand, Stephanie; Kesper, Dörthe Andrea; Teich, René; Kilic-Niebergall, Esma; Pinkenburg, Olaf; Bothur, Evita et al. (2012): DNA methylation of TH1/TH2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (6), S. 1602-10.e6. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.12.963.
- Brooks, Collin; Pearce, Neil; Douwes, Jeroen (2013): The hygiene hypothesis in allergy and asthma: an update. In: *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 13 (1), S. 70–77. DOI: 10.1097/ACI.0b013e32835ad0d2.

- Brüske, Irene; Flexeder, Claudia; Heinrich, Joachim (2014): Body mass index and the incidence of asthma in children. In: *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 14 (2), S. 155–160. DOI: 10.1097/ACI.0000000000000035.
- Bundesärztekammer et al (2014): Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma - Langfassung, 2. Auflage. Version 5. Online verfügbar unter http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/nvl-002l_S3_Asthma_2013-09.pdf, zuletzt geprüft am 03.09.2014.
- Chen, Yongxin; Gelfond, Jonathan A L; McManus, Linda M.; Shireman, Paula K. (2009): Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. In: *BMC genomics* 10, S. 407. DOI: 10.1186/1471-2164-10-407.
- Chomczynski, Piotr; Sacchi, Nicoletta (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical Biochemistry* 162 (1), S. 156–159. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90021-2.
- Chung, Goh Eun; Yoon, Jung-Hwan; Myung, Sun Jung; Lee, Jeong-Hoon; Lee, Sung-Hee; Lee, Soo-Mi et al. (2010): High expression of microRNA-15b predicts a low risk of tumor recurrence following curative resection of hepatocellular carcinoma. In: *Oncol. Rep.* 23 (1), S. 113–119.
- Clément, Thomas; Salone, Véronique; Rederstorff, Mathieu (2015): Dual luciferase gene reporter assays to study miRNA function. In: *Methods Mol. Biol.* 1296, S. 187–198. DOI: 10.1007/978-1-4939-2547-6_17.
- de Sousa Abreu, Raquel; Penalva, Luiz O.; Marcotte, Edward M.; Vogel, Christine (2009): Global signatures of protein and mRNA expression levels. In: *Molecular bioSystems* 5 (12), S. 1512–1526. DOI: 10.1039/b908315d.
- Dinesh, R.; Hahn, B. H.; La Cava, A.; Singh, R. P. (2011): Interferon-inducible gene 202b controls CD8(+) T cell-mediated suppression in anti-DNA Ig peptide-treated (NZB × NZW) F1 lupus mice. In: *Genes and immunity* 12 (5), S. 360–369. DOI: 10.1038/gene.2011.4.
- Esquela-Kerscher, Aurora; Slack, Frank J. (2006): Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. In: *Nat. Rev. Cancer* 6 (4), S. 259–269. DOI: 10.1038/nrc1840.
- Fajt, Merritt L.; Wenzel, Sally E. (2014): Biologic therapy in asthma: entering the new age of personalized medicine. In: *J Asthma* 51 (7), S. 669–676. DOI: 10.3109/02770903.2014.910221.
- Fasanaro, Pasquale; Romani, Sveva; Voellenkle, Christine; Maimone, Biagina; Capogrossi, Maurizio C.; Martelli, Fabio (2012): ROD1 is a seedless target gene of hypoxia-induced miR-210. In: *PloS one* 7 (9), S. e44651. DOI: 10.1371/journal.pone.0044651.
- Feske, Stefan (2007): Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. In: *Nat. Rev. Immunol.* 7 (9), S. 690–702. DOI: 10.1038/nri2152.

- Fields, Patrick E.; Kim, Sean T.; Flavell, Richard A. (2002): Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation. In: *J Immunol* 169 (2), S. 647–650.
- Freeley, Michael; Long, Aideen (2013a): Advances in siRNA delivery to T-cells: potential clinical applications for inflammatory disease, cancer and infection. In: *The Biochemical journal* 455 (2), S. 133–147. DOI: 10.1042/BJ20130950.
- Freeley, Michael; Long, Aideen (2013b): The two hit hypothesis: an improved method for siRNA-mediated gene silencing in stimulated primary human T cells. In: *Journal of immunological methods* 396 (1-2), S. 116–127. DOI: 10.1016/j.jim.2013.08.005.
- Friedman, Robin C.; Farh, Kyle Kai-How; Burge, Christopher B.; Bartel, David P. (2009): Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. In: *Genome Res.* 19 (1), S. 92–105. DOI: 10.1101/gr.082701.108.
- Garbacki, Nancy; Di Valentin, Emmanuel; Huynh-Thu, Vân Anh; Geurts, Pierre; Irrthum, Alexandre; Crahay, Céline et al. (2011): MicroRNAs profiling in murine models of acute and chronic asthma: a relationship with mRNAs targets. In: *PLoS ONE* 6 (1), S. e16509. DOI: 10.1371/journal.pone.0016509.
- Gebert, Luca F R; Rebhan, Mario A E; Crivelli, Silvia E M; Denzler, Rémy; Stoffel, Markus; Hall, Jonathan (2014): Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. In: *Nucleic Acids Res.* 42 (1), S. 609–621. DOI: 10.1093/nar/gkt852.
- Git, Anna; Dvinge, Heidi; Salmon-Divon, Mali; Osborne, Michelle; Kutter, Claudia; Hadfield, James et al. (2010): Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. In: *RNA (New York, N.Y.)* 16 (5), S. 991–1006. DOI: 10.1261/rna.1947110.
- Grabenhenrich, Linus B.; Gough, Hannah; Reich, Andreas; Eckers, Nora; Zepp, Fred; Nitsche, Oliver et al. (2014): Early-life determinants of asthma from birth to age 20 years: a German birth cohort study. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (4), S. 979–988. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.11.035.
- Gresch, Oliver; Engel, Felix B.; Nestic, Dobrila; Tran, Thi Thai; England, Hazel M.; Hickman, Emma S. et al. (2004): New non-viral method for gene transfer into primary cells. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 33 (2), S. 151–163. DOI: 10.1016/j.ymeth.2003.11.009.
- Guarnieri, Michael; Balmes, John R. (2014): Outdoor air pollution and asthma. In: *The Lancet* 383 (9928), S. 1581–1592. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60617-6.
- Ha, Minju; Kim, V. Narry (2014): Regulation of microRNA biogenesis. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (8), S. 509–524. DOI: 10.1038/nrm3838.
- Hanke, Merle; Hoefig, Kai; Merz, Hartmut; Feller, Alfred C.; Kausch, Ingo; Jocham, Dieter et al. (2010): A robust methodology to study urine microRNA as tumor

marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. In: *Urol. Oncol.* 28 (6), S. 655–661. DOI: 10.1016/j.urolonc.2009.01.027.

- Hayes, Josie; Peruzzi, Pier Paolo; Lawler, Sean (2014): MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. In: *Trends Mol Med* 20 (8), S. 460–469. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.06.005.
- Ho, Shuk-Mei (2010): Environmental epigenetics of asthma: an update. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 126 (3), S. 453–465. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.07.030.
- Ho, J J David; Marsden, Philip A. (2014): Competition and collaboration between RNA-binding proteins and microRNAs. In: *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 5 (1), S. 69–86. DOI: 10.1002/wrna.1197.
- Hoffman, Yonit; Pilpel, Yitzhak (2015): Gene expression. MicroRNAs silence the noisy genome. In: *Science* 348 (6230), S. 41–42. DOI: 10.1126/science.aaa9841.
- Holgate, Stephen T. (2008): Pathogenesis of asthma. In: *Clin. Exp. Allergy* 38 (6), S. 872–897. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2008.02971.x.
- Holgate, Stephen T. (2011): The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. In: *Immunol. Rev.* 242 (1), S. 205–219. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01030.x.
- Holgate, Stephen T.; Polosa, Riccardo (2008): Treatment strategies for allergy and asthma. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8 (3), S. 218–230. DOI: 10.1038/nri2262.
- <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/> (2014): BiBiServ2 - RNAhybrid. Online verfügbar unter <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>, zuletzt geprüft am 04.05.2015.
- <http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/> (2010): MicroInspector - miRNA target site software. Online verfügbar unter <http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/>, zuletzt aktualisiert am 14.09.2010, zuletzt geprüft am 04.05.2015.
- <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/> (2014): DIANA LAB - DNA Intelligent Analysis - microT v3.0 Web Server. Online verfügbar unter <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>, zuletzt geprüft am 04.05.2015.
- <http://mirdb.org/miRDB/> (2015): miRDB - MicroRNA Target Prediction And Functional Study Database. Online verfügbar unter <http://mirdb.org/miRDB/>, zuletzt aktualisiert am 10.03.2015, zuletzt geprüft am 04.05.2015.
- <http://mirecords.biolead.org/> (2014): miRecords. Online verfügbar unter <http://mirecords.biolead.org/>, zuletzt geprüft am 04.01.2015.
- <http://pictar.mdc-berlin.de/> (2012): PicTar. Online verfügbar unter <http://pictar.mdc-berlin.de/>, zuletzt aktualisiert am 16.03.2012, zuletzt geprüft am 04.05.2015.
- <http://www.microrna.org/microrna/home.do> (2014): microRNA.org. Online verfügbar unter <http://www.microrna.org/microrna/home.do>, zuletzt geprüft am 04.05.2015.

- <http://www.mirbase.org/> (2014): miRBase. Online verfügbar unter <http://www.mirbase.org/>, zuletzt geprüft am 04.01.2015.
- <http://www.targetscan.org/> (2014): TargetScanHuman 6.2. Online verfügbar unter <http://www.targetscan.org/>, zuletzt aktualisiert am 17.11.2014, zuletzt geprüft am 04.05.2015.
- <https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/> (2014): RNA22 v2. Online verfügbar unter <https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/>, zuletzt geprüft am 04.05.2015.
- Huang, Zhaohui; Huang, Dan; Ni, Shujuan; Peng, Zhilei; Sheng, Weiqi; Du, Xiang (2010): Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. In: *Int. J. Cancer* 127 (1), S. 118–126. DOI: 10.1002/ijc.25007.
- Janssen, Harry L A; Reesink, Hendrik W.; Lawitz, Eric J.; Zeuzem, Stefan; Rodriguez-Torres, Maribel; Patel, Keyur et al. (2013): Treatment of HCV infection by targeting microRNA. In: *N. Engl. J. Med.* 368 (18), S. 1685–1694. DOI: 10.1056/NEJMoa1209026.
- Jardim, Melanie J.; Dailey, Lisa; Silbajoris, Robert; Diaz-Sanchez, David (2012): Distinct microRNA expression in human airway cells of asthmatic donors identifies a novel asthma-associated gene. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 47 (4), S. 536–542. DOI: 10.1165/rcmb.2011-01600C.
- Jeker, Lukas T.; Bluestone, Jeffrey A. (2013): MicroRNA regulation of T-cell differentiation and function. In: *Immunol. Rev.* 253 (1), S. 65–81. DOI: 10.1111/imr.12061.
- Jens, Marvin; Rajewsky, Nikolaus (2015): Competition between target sites of regulators shapes post-transcriptional gene regulation. In: *Nat. Rev. Genet.* 16 (2), S. 113–126. DOI: 10.1038/nrg3853.
- Jones, Brendan; Chen, Jianzhu (2006): Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. In: *The EMBO journal* 25 (11), S. 2443–2452. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601148.
- Karow, Thomas (2014): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis 2014 ; [Markierung der Prüfungsfakten des "Hammerexamens" bis 04. 22. Aufl. Pulheim: [Selbstverl.
- Ketroussi, Farah; Giuliani, Massimo; Bahri, Rajia; Azzarone, Bruno; Charpentier, Bernard; Durrbach, Antoine (2011): Lymphocyte cell-cycle inhibition by HLA-G is mediated by phosphatase SHP-2 and acts on the mTOR pathway. In: *PloS one* 6 (8), S. e22776. DOI: 10.1371/journal.pone.0022776.
- Kim, Sung-Kyu; Nam, Jin-Wu; Rhee, Je-Keun; Lee, Wha-Jin; Zhang, Byoung-Tak (2006): miTarget: microRNA target gene prediction using a support vector machine. In: *BMC Bioinformatics* 7, S. 411. DOI: 10.1186/1471-2105-7-411.

- Kozomara, Ana; Griffiths-Jones, Sam (2011): miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. In: *Nucleic Acids Res.* 39 (Database issue), S. D152-7. DOI: 10.1093/nar/gkq1027.
- Kozomara, Ana; Griffiths-Jones, Sam (2014): miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. In: *Nucleic acids research* 42 (Database issue), S. D68-73. DOI: 10.1093/nar/gkt1181.
- Lal, Ashish; Navarro, Francisco; Maher, Christopher A.; Maliszewski, Laura E.; Yan, Nan; O'Day, Elizabeth et al. (2009): miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. In: *Molecular cell* 35 (5), S. 610–625. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.08.020.
- Latzin, Philipp (2013): Luftschadstoffe und Asthma im Kindesalter. In: *Ther Umsch* 70 (12), S. 708–713. DOI: 10.1024/0040-5930/a000468.
- Leckie, Margaret J.; Brinke, Anneke ten; Khan, Jamey; Diamant, Zuzana; O'Connor, Brian J.; Walls, Christine M. et al. (2000): Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. In: *The Lancet* 356 (9248), S. 2144–2148. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)03496-6.
- Lee, Dong U.; Agarwal, Suneet; Rao, Anjana (2002): Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. In: *Immunity* 16 (5), S. 649–660.
- Lee, Rosalind; Feinbaum, Rhonda; Ambros, Victor (2004): A short history of a short RNA. In: *Cell* 116, S. S89-S92. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00035-2.
- Lee, Rosalind C.; Feinbaum, Rhonda L.; Ambros, Victor (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. In: *Cell* 75 (5), S. 843–854. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
- Lennox, Kim A.; Behlke, Mark A. (2010): A direct comparison of anti-microRNA oligonucleotide potency. In: *Pharmaceutical research* 27 (9), S. 1788–1799. DOI: 10.1007/s11095-010-0156-0.
- Lewis, Benjamin P.; Burge, Christopher B.; Bartel, David P. (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. In: *Cell* 120 (1), S. 15–20. DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.035.
- Li, Jinbo; Tan, Subee; Kooger, Romain; Zhang, Chenyu; Zhang, Yan (2014): MicroRNAs as novel biological targets for detection and regulation. In: *Chem Soc Rev* 43 (2), S. 506–517. DOI: 10.1039/c3cs60312a.
- Liu, Bing; Li, Jiuyong; Cairns, Murray J. (2014): Identifying miRNAs, targets and functions. In: *Briefings in bioinformatics* 15 (1), S. 1–19. DOI: 10.1093/bib/bbs075.

- Liu, Feng; Qin, Hou-Bing; Xu, Bing; Zhou, Hui; Zhao, De-Yu (2012): Profiling of miRNAs in pediatric asthma: upregulation of miRNA-221 and miRNA-485-3p. In: *Mol Med Rep* 6 (5), S. 1178–1182. DOI: 10.3892/mmr.2012.1030.
- Lloyd, Clare M.; Hessel, Edith M. (2010): Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. In: *Nature reviews. Immunology* 10 (12), S. 838–848. DOI: 10.1038/nri2870.
- Lu, T. X.; Munitz, A.; Rothenberg, M. E. (2009): MicroRNA-21 Is Up-Regulated in Allergic Airway Inflammation and Regulates IL-12p35 Expression. In: *The Journal of Immunology* 182 (8), S. 4994–5002. DOI: 10.4049/jimmunol.0803560.
- Lu, Thomas X.; Hartner, Jochen; Lim, Eun-Jin; Fabry, Victoria; Mingler, Melissa K.; Cole, Eric T. et al. (2011): MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity. In: *J. Immunol.* 187 (6), S. 3362–3373. DOI: 10.4049/jimmunol.1101235.
- Ma, Feng; Xu, Sheng; Liu, Xingguang; Zhang, Qian; Xu, Xiongfei; Liu, Mofang et al. (2011): The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . In: *Nature immunology* 12 (9), S. 861–869. DOI: 10.1038/ni.2073.
- Maegdefessel, L. (2014): The emerging role of microRNAs in cardiovascular disease. In: *J. Intern. Med.* 276 (6), S. 633–644. DOI: 10.1111/joim.12298.
- Maragkakis, Manolis; Alexiou, Panagiotis; Papadopoulos, Giorgio L.; Reczko, Martin; Dalamagas, Theodore; Giannopoulos, George et al. (2009): Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. In: *BMC Bioinformatics* 10, S. 295. DOI: 10.1186/1471-2105-10-295.
- Mestdagh, Pieter; Feys, Tom; Bernard, Nathalie; Guenther, Simone; Chen, Caifu; Speleman, Frank; Vandesomepele, Jo (2008): High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. In: *Nucleic acids research* 36 (21), S. e143. DOI: 10.1093/nar/gkn725.
- Miranda, Kevin C.; Huynh, Tien; Tay, Yvonne; Ang, Yen-Sin; Tam, Wai-Leong; Thomson, Andrew M. et al. (2006): A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. In: *Cell* 126 (6), S. 1203–1217. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.031.
- Nicolas, Francisco E. (2011): Experimental validation of microRNA targets using a luciferase reporter system. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 732, S. 139–152. DOI: 10.1007/978-1-61779-083-6_11.
- Nordlund, Björn; Melén, Erik; Schultz, Erica S.; Grönlund, Hans; Hedlin, Gunilla; Kull, Inger (2014): Risk factors and markers of asthma control differ between asthma subtypes in children. In: *Pediatr Allergy Immunol.* DOI: 10.1111/pai.12271.

- O'Shea, John J.; Paul, William E. (2010): Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. In: *Science* 327 (5969), S. 1098–1102. DOI: 10.1126/science.1178334.
- Park, Noh Jin; Zhou, Hui; Elashoff, David; Henson, Bradley S.; Kastratovic, Dragana A.; Abemayor, Elliot; Wong, David T. (2009): Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. In: *Clin. Cancer Res.* 15 (17), S. 5473–5477. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0736.
- Pasquinelli, Amy E. (2012a): MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. In: *Nat. Rev. Genet.* 13 (4), S. 271–282. DOI: 10.1038/nrg3162.
- Pasquinelli, Amy E. (2012b): MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. In: *Nat. Rev. Genet.* 13 (4), S. 271–282. DOI: 10.1038/nrg3162.
- Pekarsky, Y.; Croce, C. M. (2014): Role of miR-15/16 in CLL. In: *Cell Death Differ.* DOI: 10.1038/cdd.2014.87.
- Pelaia, Girolamo; Vatrella, Alessandro; Maselli, Rosario (2012): The potential of biologics for the treatment of asthma. In: *Nat Rev Drug Discov* 11 (12), S. 958–972. DOI: 10.1038/nrd3792.
- Peterson, Sarah M.; Thompson, Jeffrey A.; Ufkin, Melanie L.; Sathyanarayana, Pradeep; Liaw, Lucy; Congdon, Clare Bates (2014): Common features of microRNA target prediction tools. In: *Frontiers in genetics* 5, S. 23. DOI: 10.3389/fgene.2014.00023.
- Pillai, Ramesh S. (2005): MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? In: *RNA (New York, N.Y.)* 11 (12), S. 1753–1761. DOI: 10.1261/rna.2248605.
- Porsbjerg, Celeste; Linstow, Marie-Louise von; Ulrik, Charlotte Suppli; Nepper-Christensen, Steen; Backer, Vibeke (2006): Risk factors for onset of asthma: a 12-year prospective follow-up study. In: *Chest* 129 (2), S. 309–316. DOI: 10.1378/chest.129.2.309.
- Pritchard, Colin C.; Cheng, Heather H.; Tewari, Muneesh (2012): MicroRNA profiling: approaches and considerations. In: *Nature reviews. Genetics* 13 (5), S. 358–369. DOI: 10.1038/nrg3198.
- Rebane, Ana; Akdis, Cezmi A. (2014): MicroRNAs in allergy and asthma. In: *Curr Allergy Asthma Rep* 14 (4), S. 424. DOI: 10.1007/s11882-014-0424-x.
- Reddel et al (2014): Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2014. Available from www.ginasthma.org.
- Rehmsmeier, Marc; Steffen, Peter; Hochsmann, Matthias; Giegerich, Robert (2004): Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. In: *RNA (New York, N.Y.)* 10 (10), S. 1507–1517. DOI: 10.1261/rna.5248604.

- Robert Koch-Institut (Hrsg) (2012): Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2010«. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) (2014): Asthma bronchiale. Faktenblatt zu GEDA 2012: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2012«. RKI, Berlin www.rki.de/geda (Stand: 08.04.2015).
- Sawant, Deepali V.; Wu, Hao; Kaplan, Mark H.; Dent, Alexander L. (2013): The Bcl6 target gene microRNA-21 promotes Th2 differentiation by a T cell intrinsic pathway. In: *Mol. Immunol.* 54 (3-4), S. 435–442. DOI: 10.1016/j.molimm.2013.01.006.
- Selbach, Matthias; Schwanhäusser, Björn; Thierfelder, Nadine; Fang, Zhuo; Khanin, Raya; Rajewsky, Nikolaus (2008): Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. In: *Nature* 455 (7209), S. 58–63. DOI: 10.1038/nature07228.
- Shin, Chanseok; Nam, Jin-Wu; Farh, Kyle Kai-How; Chiang, H. Rosaria; Shkumatava, Alena; Bartel, David P. (2010): Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. In: *Molecular cell* 38 (6), S. 789–802. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.06.005.
- Simons, Elinor; To, Teresa; Moineddin, Rahim; Stieb, David; Dell, Sharon D. (2014): Maternal second-hand smoke exposure in pregnancy is associated with childhood asthma development. In: *J Allergy Clin Immunol Pract* 2 (2), S. 201–207. DOI: 10.1016/j.jaip.2013.11.014.
- Smith, Kristen M.; Guerau-de-Arellano, Mireia; Costinean, Stefan; Williams, Jessica L.; Bottoni, Arianna; Mavrikis Cox, Gina et al. (2012): miR-29ab1 deficiency identifies a negative feedback loop controlling Th1 bias that is dysregulated in multiple sclerosis. In: *J. Immunol.* 189 (4), S. 1567–1576. DOI: 10.4049/jimmunol.1103171.
- Solberg, Owen D.; Ostrin, Edwin J.; Love, Michael I.; Peng, Jeffrey C.; Bhakta, Nirav R.; Hou, Lydia et al. (2012): Airway epithelial miRNA expression is altered in asthma. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186 (10), S. 965–974. DOI: 10.1164/rccm.201201-0027OC.
- Sommers, Connie L.; Rouquette-Jazdanian, Alexandre K.; Robles, Ana I.; Kortum, Robert L.; Merrill, Robert K.; Li, Wenmei et al. (2013): miRNA signature of mouse helper T cell hyper-proliferation. In: *PLoS ONE* 8 (6), S. e66709. DOI: 10.1371/journal.pone.0066709.
- Steiner, David F.; Thomas, Molly F.; Hu, Joyce K.; Yang, Zhiyong; Babiarz, Joshua E.; Allen, Christopher D. C. et al. (2011): MicroRNA-29 regulates T-box transcription factors and interferon- γ production in helper T cells. In: *Immunity* 35 (2), S. 169–181. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.07.009.

- Stenvang, Jan; Petri, Andreas; Lindow, Morten; Obad, Susanna; Kauppinen, Sakari (2012): Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. In: *Silence* 3 (1), S. 1. DOI: 10.1186/1758-907X-3-1.
- Strober, Warren; Gottesman, Susan R. S.; Coico, Richard (2009): Immunology. Clinical case studies and disease pathophysiology. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell.
- Sullivan, Ryan P.; Leong, Jeffrey W.; Schneider, Stephanie E.; Keppel, Catherine R.; Germino, Elizabeth; French, Anthony R.; Fehniger, Todd A. (2012): MicroRNA-deficient NK cells exhibit decreased survival but enhanced function. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (7), S. 3019–3030. DOI: 10.4049/jimmunol.1102294.
- Sun, Lei; Wu, Jingjing; Yi, Shouan (2012): Foxp3 is critical for human natural CD4+CD25+ regulatory T cells to suppress alloimmune response. In: *Transplant immunology* 26 (2-3), S. 71–80. DOI: 10.1016/j.trim.2011.10.005.
- Tahvanainen, Johanna; Pykäläinen, Maritta; Kallonen, Teemu; Lähteenmäki, Hanna; Rasool, Omid; Lahesmaa, Riitta (2006): Enrichment of nucleofected primary human CD4+ T cells: a novel and efficient method for studying gene function and role in human primary T helper cell differentiation. In: *Journal of immunological methods* 310 (1-2), S. 30–39. DOI: 10.1016/j.jim.2005.11.024.
- Thomas, Marshall; Lieberman, Judy; Lal, Ashish (2010): Desperately seeking microRNA targets. In: *Nature structural & molecular biology* 17 (10), S. 1169–1174. DOI: 10.1038/nsmb.1921.
- Torgerson, Troy R.; Genin, Anna; Chen, Chunxia; Zhang, Mingce; Zhou, Bin; Añover-Sombke, Stephanie et al. (2009): FOXP3 inhibits activation-induced NFAT2 expression in T cells thereby limiting effector cytokine expression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (2), S. 907–915. DOI: 10.4049/jimmunol.0800216.
- Vogel, Christine; Marcotte, Edward M. (2012): Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. In: *Nature reviews. Genetics* 13 (4), S. 227–232. DOI: 10.1038/nrg3185.
- Wang, Xiaowei (2014): Composition of seed sequence is a major determinant of microRNA targeting patterns. In: *Bioinformatics* 30 (10), S. 1377–1383. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu045.
- Watson, James D. (2011): Watson Molekularbiologie. [Dt. Übersetzung der] 6., aktualis. Auflage. München: Pearson Studium (bio biologie).
- Weiland, Matthew; Gao, Xing-Hua; Zhou, Li; Mi, Qing-Sheng (2012): Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases. In: *RNA Biol* 9 (6), S. 850–859. DOI: 10.4161/rna.20378.
- Wong, Nathan; Wang, Xiaowei (2015): miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. In: *Nucleic Acids Res.* 43 (Database issue), S. D146-52. DOI: 10.1093/nar/gku1104.

- Wu, Haoquan; Neilson, Joel R.; Kumar, Priti; Manocha, Monika; Shankar, Premlata; Sharp, Phillip A.; Manjunath, N. (2007): miRNA profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells. In: *PLoS ONE* 2 (10), S. e1020. DOI: 10.1371/journal.pone.0001020.
- Xia, Hongping; Qi, Yanting; Ng, Samuel S.; Chen, Xiaona; Chen, Shen; Fang, Marong et al. (2009): MicroRNA-15b regulates cell cycle progression by targeting cyclins in glioma cells. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380 (2), S. 205–210. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.12.169.
- Xiao, Feifei; Zuo, Zhixiang; Cai, Guoshuai; Kang, Shuli; Gao, Xiaolian; Li, Tongbin (2009): miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. In: *Nucleic acids research* 37 (Database issue), S. D105-10. DOI: 10.1093/nar/gkn851.
- Yin, Jiyi; Ma, Zhengyu; Selliah, Nithianandan; Shivers, Debra K.; Cron, Randy Q.; Finkel, Terri H. (2006): Effective gene suppression using small interfering RNA in hard-to-transfect human T cells. In: *Journal of immunological methods* 312 (1-2), S. 1–11. DOI: 10.1016/j.jim.2006.01.023.
- Young, Jennifer A.; Ting, Ka Ka; Li, Jia; Moller, Thorleif; Dunn, Louise; Lu, Ying et al. (2013): Regulation of vascular leak and recovery from ischemic injury by general and VE-cadherin-restricted miRNA antagonists of miR-27. In: *Blood* 122 (16), S. 2911–2919. DOI: 10.1182/blood-2012-12-473017.
- Zhang, Mingce; Ma, Zhengyu; Selliah, Nithianandan; Weiss, Greta; Genin, Anna; Finkel, Terri H.; Cron, Randy Q. (2014a): The impact of Nucleofection® on the activation state of primary human CD4 T cells. In: *Journal of immunological methods* 408, S. 123–131. DOI: 10.1016/j.jim.2014.05.014.
- Zhang, Yanju; Verbeek, Fons J. (2010): Comparison and integration of target prediction algorithms for microRNA studies. In: *Journal of integrative bioinformatics* 7 (3). DOI: 10.2390/biecoll-jib-2010-127.
- Zhang, Yuan; Zhang, Yaguang; Gu, Wangpeng; Sun, Bing (2014b): Erratum to: Th1/Th2 Cell Differentiation and Molecular Signals. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 841, S. E1-2. DOI: 10.1007/978-94-017-9487-9_9.
- Zhong, Guocheng; Cheng, Xiaoming; Long, Haixia; He, Luhang; Qi, Wei; Xiang, Tong et al. (2013): Dynamically expressed microRNA-15b modulates the activities of CD8+ T lymphocytes in mice with Lewis lung carcinoma. In: *J Transl Med* 11, S. 71. DOI: 10.1186/1479-5876-11-71.
- Zhou, Honglei; Rigoutsos, Isidore (2014): MiR-103a-3p targets the 5' UTR of GPRC5A in pancreatic cells. In: *RNA* 20 (9), S. 1431–1439. DOI: 10.1261/rna.045757.114.
- Zubakov, Dmitry; Boersma, Anton W M; Choi, Ying; van Kuijk, Patricia F; Wiemer, Erik A C; Kayser, Manfred (2010): MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. In: *International journal of legal medicine* 124 (3), S. 217–226. DOI: 10.1007/s00414-009-0402-3.mn

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen/Herren:

Bartsch, Basler, Baum, Becker K., Becker S., Bien, Czubayko, Daut, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gress, Grzeschik, Hertl, Hilt, Höffken, Hofmann, Hoyer, Kalder, Käuser, Kill, Klose, Kohlmann, Kruse, Lill, Lingenfelder, Lohoff, Maisch, Meier, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Rausch, Renz, Richter, Röhm, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schmidt, Seifart, Sekundo, Suske, Teymoortash, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Wulf und Zwiorek.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Die Rolle der microRNA-15b in der Pathogenese des experimentellen allergischen Asthma bronchiale“

im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik, unter Leitung von Prof. Dr. med. Harald Renz mit Unterstützung von Dr. rer. physiol. Ayşe Kiliç ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)