

Aus dem Institut für Humangenetik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Dynamik und Wirkung der microRNA-Expression in der
frühen Phase der humanen CD4+ T-Zell-Aktivierung**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2021

vorgelegt von
Caroline Elisabeth Diener
geb. am 04.10.1991
in Neunkirchen/Saar

Tag der Promotion:	17. Februar 2022
Dekan:	Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese
	Prof. Dr. rer. nat. Uwe Walldorf
	Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hankeln

„In den kleinsten Dingen zeigt die Natur
die allergrößten Wunder.“

Carl von Linné

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Zusammenfassung	1
Summary	3
2. Einleitung	5
2.1. Nicht-kodierende RNAs zur Kontrolle der Gen-Expression	5
2.2. MiRNAs: Biogenese, Einfluss auf zelluläre Signalprozesse und mögliche klinische Anwendung	6
2.3. Das Immunsystem	9
2.4. T-Zellen als wichtiger Bestandteil der adaptiven Immunantwort	10
2.5. Bedeutung von miRNAs für die Funktion von T-Zellen	12
2.6. Wissenschaftlicher Ausgangspunkt: MiRNA-Expression im Rahmen der T-Zell-Aktivierung	13
2.7. Zielsetzung	15
3. Material und Methoden	16
3.1. Übersicht verwendeter Materialien	16
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien	16
3.1.2. Puffer- und Lösungsrezeptur	17
3.1.3. DNA-Größenstandard	18
3.1.4. Oligonukleotid-Primer	18
3.1.5. Synthetische miRNA-Oligonukleotide	21
3.1.6. Plasmidvektoren	22
3.1.7. Laborgeräte	27
3.1.8. Sonstige Materialien	29
3.1.9. Software, in-silico Tools und Websites	30
3.2. Experimente mit humanen T-Zellen	32
3.2.1. Entnahme von Spenderblut und Erstellung des Hämatogrammes	32
3.2.2. Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	33
3.2.3. Negative Immunselektion von CD4+ T-Zellen	34
3.2.4. Bestimmung des Reinheitsgrades von isolierten CD4+ T-Zellen	35

3.2.5. In vitro Aktivierung von T-Zellen und Sammeln von Zeitverlaufproben	36
3.3. Experimente mit humanen Zelllinien	37
3.3.1. Kultivierung humaner Zelllinien	37
3.3.2. Chemische Transfektion	38
3.3.3. Bestimmung der Zellanzahl bei den Experimenten mit humanen Zelllinien	39
3.3.4. Duale Luciferase-Reporter-Gen-Assays	39
3.4. Hitzeschock-Transformation und Amplifikation von Plasmiden im bakteriellen System	42
3.5. DNA-basierte Methoden	43
3.5.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur in vitro Amplifikation von DNA-Sequenzen	43
3.5.2. Kolonie-PCR zur Identifizierung von erfolgreich transformierten Bakterien	44
3.5.3. Zielgerichtete Mutagenese potenzieller miRNA-Bindestellen mittels Overlap Extension PCR	46
3.5.4. Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	48
3.5.5. Restriktionsverdau zur enzymatischen Spaltung von DNA	49
3.5.6. Ligation von DNA-Fragmenten	51
3.5.7. Isolation von DNA-Proben aus Enzym-Reaktionen und Agarosegelen	52
3.5.8. Isolation von Plasmid-DNA	52
3.5.9. Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	53
3.5.10. Sequenzierung rekombinanter Reporterplasmide	54
3.6. RNA-basierte Methoden	55
3.6.1. Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion von zellulärer RNA	55
3.6.2. Fluorometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	55
3.6.3. Bestimmung der RNA-Integrität	56
3.6.4. Herstellung einer cDNA-Bank mittels reverser Transkription	57
3.6.5. Hoch-Durchsatz-Analyse von mRNA- und miRNA-Expressionsprofilen auf Grundlage des Microarray-Verfahrens	58
3.6.6. Verfahren zur miRNA-Quantifizierung auf Grundlage der Microarray-Daten	61
3.6.7. Validierung von zeitaufgelösten RNA-Expressionsprofilen durch Taqman-Analysen	64
3.7. Auswertung und bioinformatische Analyse der Microarray-Daten	69
3.7.1. Bioinformatische Prozessierung der Microarray-Rohdaten	69
3.7.2. Auswertungen zur Ermittlung von miRNA-Kandidaten mit deutlicher Expressionsveränderung im Kontext des Aktivierungsprozesses	70
3.7.3. Klassifikation von zeitaufgelösten miRNA-Expressionsprofilen	71
3.7.4. Funktionelle Analyse von Signalwegen der T-Zell-Aktivierung	72
3.8. Methoden auf Grundlage bioinformatischer Tools	72

3.8.1. Analyse von miRNA-Zielgen-Netzwerken	72
3.8.2. Vorhersage von miRNA-Zielgenen	73
3.8.3. Ermittlung von zellulären Funktionen der identifizierten miRNA-Zielgene	78
4. Ergebnisse	79
4.1. Methodische Vorgehensweise zur Erfassung der zeitaufgelösten RNA-Expressionsprofile	79
4.2. Kontroll-Analysen der zu Grunde liegenden Parameter bei der Erfassung und Auswertung der zeitaufgelösten RNA-Expressionsprofile	81
4.3. Identifizierung von miRNAs mit deutlicher und reproduzierbarer Expressionsveränderung im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses	87
4.4. Klassifikation von zeitaufgelösten miRNA-Expressionsmustern im Zusammenhang mit der T-Zell-Aktivierung	94
4.5. Identifizierung von Zielgenen zur funktionellen Charakterisierung der miR-155-5p97	
4.6. Etablierung und Validierung eines Verfahrens zur quantitativen Analyse der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten	106
4.6.1. Relative Quantifizierung von miRNA-Expressionsveränderungen	107
4.6.2. Absolute Quantifizierung der miRNA-Expression	114
4.7. Detektion von miRNAs mit prominenter molekularer Expression	116
4.8. Identifizierung und funktioneller Nachweis von kooperativen miRNA-Paaren	121
4.9. Spezifizierung der quantitativen miR-155-5p-Expressionsdaten	130
5. Diskussion	133
5.1. Evaluierung der miRNA-Expressionsanalysen	133
5.1.1. Analyse von zeitaufgelösten miRNA-Expressionsprofilen mithilfe des Microarray-Verfahrens	133
5.1.2. Eichung des Microarray-Analysesystems zur quantitativen Auswertung der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten	136
5.1.3. Vergleichende Expressionsanalysen zur Identifizierung von zentralen miRNAs	138
5.1.4. Identifizierung von miRNA-Zielgenen unter Einbezug der mRNA-Expressionsdaten	141
5.2. Koordinierung und Funktion von veränderten miRNAs	143
5.2.1. Koordinierung der miRNA-Expressionsdynamik	143
5.2.2. Spezifische Funktionen und funktionelle Interaktionen von miRNAs	147
5.3. Potenzial zur anwendungsbasierten Nutzung der miRNA-Expressionsinformationen	151
5.3.1. Mögliche Nutzung im Rahmen der Biomarker-Forschung	151

5.3.2. Möglicher Nutzen für die Entwicklung von miRNA-basierten Therapien	152
5.4. Fazit und Ausblick	154
6. Literaturverzeichnis	155
7. Anhang	183
7.1. Tabellen im Anhang	183
7.2. Abbildungen im Anhang	195
8. Publikationsliste	202
9. Danksagung	204
10. Lebenslauf	206

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Überblick zur miRNA-Biogenese.	7
Abbildung 2: T-Zell-Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen.	11
Abbildung 3: DNA-Fragmentgrößen der Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder.....	18
Abbildung 4: Vektorkarte des pSG5-Expressionsplasmids.	23
Abbildung 5: Vektorkarte des pMIR-RNL-TK-Reporterplasmids.	25
Abbildung 6: Schematischer Überblick zur Funktionsweise des dualen Luciferase-Assays.	40
Abbildung 7: Schematischer Überblick einer <i>Overlap Extension PCR</i>	47
Abbildung 8: Schematischer Überblick zum Grundprinzip des Microarray-Verfahrens.....	59
Abbildung 9: Schematischer Überblick des Taqman-Verfahrens.	66
Abbildung 10: Methodische Übersicht zur Erfassung der zeitaufgelösten miRNA- und mRNA- Expressionsdaten im Zusammenhang mit den ersten 24 h der humanen T-Zell-Aktivierung.	80
Abbildung 11: Reinheitskontrolle der isolierten CD4+ T-Zellen sowie quantitative und qualitative Kontrolle der extrahierten zellulären RNA-Proben.	84
Abbildung 12: Expressionsanalysen zur Kontrolle des T-Zell-Aktivierungsprozesses.	86
Abbildung 13: Identifizierung von zentralen miRNAs mit deutlicher Expressionsveränderung im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses.....	88
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung zur Veranschaulichung der Ähnlichkeit zwischen den zeitaufgelösten miRNA-Expressionsmustern.....	89
Abbildung 15: Korrelation der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten zwischen den technischen Replikaten und zwischen den unterschiedlichen Spendern.	91
Abbildung 16: Vergleichende Analysen zur Reproduzierbarkeit der zeitaufgelösten miRNA- Expressionsmuster.....	94
Abbildung 17: Repräsentative Expressionsprofil-Klassen, bestehend aus miRNAs mit gemeinsamen zeitaufgelösten Expressionsmustern.	96
Abbildung 18: Übersicht zur Vorhersage und Auswahl potenzieller miR-155-5p-Zielgene.	98
Abbildung 19: Ergebnisse der Hoch-Durchsatz Luciferase-Reporter-Gen-Assays zur Identifizierung von Zielgenen der miR-155-5p.	100
Abbildung 20: Validierung der Hoch-Durchsatz Luciferase-Reporter-Gen-Assays.....	101
Abbildung 21: Methodische Übersicht zur Microarray-Eichung für die relative Quantifizierung der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten.....	108
Abbildung 22: Eichgeraden zur relativen Quantifizierung von exemplarischen miRNA- Expressionsveränderungen im Vergleich zum zellulären Ruhezustand.....	109

Abbildung 23: Relative Quantifizierung von miRNA-Expressionsveränderungen vor dem Hintergrund des zellulären Ruhezustands.	111
Abbildung 24: Vergleich zwischen den Ergebnissen der Microarray und der Taqman basierten relativen miRNA-Quantifizierung.	113
Abbildung 25: Bestimmung und Überprüfung einer universellen Eichkurve zur absoluten miRNA-Quantifizierung.	115
Abbildung 26: Verteilung der detektierten miRNAs bezüglich der maximalen molekularen Expressionsmenge sowie der maximalen Expressionsänderung.	119
Abbildung 27: Verteilung der identifizierten miRNAs (n=39) bezüglich der maximalen Expressionsmenge sowie der maximalen Expressionsänderung.	120
Abbildung 28: Molekulare Expressionsänderungen der miRNAs, welche als Ausgangskandidaten für die Bestimmung der funktionell interagierenden miRNA-Paare dienten.	122
Abbildung 29: MiRNA-Zielgen-Netzwerke zur Identifizierung von miRNA-Paarungen mit möglicher kooperativer Funktion im Zusammenhang mit der initialen T-Zell-Aktivierungsphase.	124
Abbildung 30: Duale Luciferase-Reportergen-Assays zur Analyse der 3'UTR des <i>IL1RAP</i> -Gens im Hinblick auf eine gemeinsame regulatorische Wirkung der miR-155-5p und der miR-21-5p.	127
Abbildung 31: Duale Luciferase-Reportergen-Assays zur Analyse der 3'UTR des <i>LEMD3</i> -Gens im Hinblick auf eine gemeinsame regulatorische Wirkung der miR-155-5p und der miR-21-5p.	129
Abbildung 32: Spezifische Quantifizierung der miR-155-5p-Expression mit Bezug zur analysierten Gesamt-Menge der zellulären RNA.	131
Abbildung A 1: Expressionskontrollen der pSG5-miR-21- und pSG5-miR-155-Effektorplasmide.	195
Abbildung A 2: Analyseergebnisse der mitgeführten Positivkontrolle im Rahmen der dualen Hoch-Durchsatz-Luciferase-Assays.	196
Abbildung A 3: Übersicht der zeitaufgelösten mRNA-Expressionsverläufe zu den mittels dualen Hoch-Durchsatz-Luciferase-Assays getesteten potenziellen miR-155-5p-Zielgenen.	197
Abbildung A 4: Vergleich zwischen Hintergrund-RNA und 0 h Zeitpunkt der Zeitverlaufsanalysen.	197
Abbildung A 5: Eichgeraden der quantitativen Taqman-Analysen.	198
Abbildung A 6: Vergleichende Ergebnisse zur Quantifizierung der miRNA-Expressionsänderungen auf Grundlage der absoluten Eichkurve und der relativen Eichkurven.	199

Abbildung A 7: Exemplarische Darstellung zur Veranschaulichung der allgemeinen Ähnlichkeit zwischen den quantitativen Daten der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsanalysen..... 200

Abbildung A 8: Korrelation der quantifizierten, zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten zwischen den technischen Replikaten und zwischen den unterschiedlichen Spendern. ... 201

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-*Primer* zur Amplifikation von 3'UTR-Sequenzen vorhergesagter miRNA-Zielgene. 19

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-*Primer* zur Amplifikation der Polylinker-Region des pMIR-RNL-TK-Reporterplasmids (pMIR-*Primer*). 20

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotid-*Primer* zur Mutagenese vorhergesagter Bindestellen in den 3'UTR-Sequenzen potenzieller miRNA-Zielgene. 20

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten miRNA-Oligonukleotide..... 21

Tabelle 5: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten pMIR-RNL-TK-3'UTR-Reporterkonstrukte..... 26

Tabelle 6: Entwickler und Websites der verwendeten Software und *Tools*. 31

Tabelle 7: Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes der Polymerase-Kettenreaktion. 44

Tabelle 8: Temperaturprogramm zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion. 44

Tabelle 9: Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes der Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion. 45

Tabelle 10: Temperaturprogramm zur Durchführung der Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion. 46

Tabelle 11: Zusammensetzung des typischen Reaktionsansatzes zur enzymatischen Spaltung von DNA mittels Restriktionsverdau. 50

Tabelle 12: Zusammensetzung des typischen Reaktionsansatzes zur Ligation von *Insert*-DNA und pMIR-RNL-TK-Reporterplasmid..... 51

Tabelle 13: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TaqMan™ microRNA assays. 64

Tabelle 14: Übersicht über mögliche miR-155-5p-Bindestellen in den zugehörigen 3'UTR-Sequenzen der mittels dualen Hoch-Durchsatz Luciferase-Reportergeräten getesteten Gene. 74

Tabelle 15: Übersicht über mögliche miR-155-5p- bzw. miR-21-5p-Bindestellen in den zugehörigen 3'UTR-Sequenzen der mittels dualen Luciferase-Reportergeräten getesteten potenziellen Zielgene. 77

Tabelle 16: Hämatogramm-Daten der Spender 1 und 2 vom Zeitpunkt der Blutentnahme. 82

Tabelle 17: Übersicht zur Funktion der identifizierten miR-155-5p-Zielgene. 103

Tabelle A 1: Übersicht der gemeinsamen, signifikant und deutlich veränderten miRNAs.....	183
Tabelle A 2: Übersicht zu den mittels dualen Hoch-Durchsatz-Luciferase-Assays getesteten potenziellen Zielgenen der miR-155-5p.....	185
Tabelle A 3: Ergebnisübersicht der Hoch-Durchsatz Luciferase-Reporter-Gen-Assays zur Identifizierung von Zielgenen der miR-155-5p.....	187
Tabelle A 4: Übersicht prominenter miRNAs mit vergleichsweise hoher molekularer Expressionsmenge und bzw. oder starker Expressionsveränderung im Zusammenhang mit der T-Zell-Aktivierung.....	188

Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ (Maßeinheit)	Mikro (10^{-6})
3' UTR	3' untranslatierte Region
A	Adenin
a (Präfix)	Atto (10^{-18})
adj.	Adjustiert
Ago	Argonaut-Protein
A_{\max}	Absorptionsmaximum
Amp/AmpR	Ampicillin/Ampicillin-Resistenzgen
antimiRs	miRNA-Inhibitoren
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen-presenting cell</i>)
APC (im Zusammenhang mit Antikörpern)	Allophycocyanin
AREs	Adenylat-Uridylat-reiche Elemente (<i>AU-rich elements</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
B-Zelle/B-Lymphozyt	Knochenmark (<i>bone marrow</i>) gereifter Lymphozyt
C	Cytosin
CD(+)	<i>Cluster of Differentiation</i> Molekül (positiv)
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Chr	Chromosom
CMV	Cytomegalievirus
c-Myc	Myc proto-oncogene, basic helix-loop-helix transcription factor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _q	<i>Quantitation cycle</i>
d (Präfix)	Dezi (10^{-1})
DAMP	Schadens-assoziierte molekulare Muster (<i>damage-associated molecular patterns</i>)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Bedeutung
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	Doppelt deionisiertes Wasser
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
f (Präfix)	Femto (10 ⁻¹⁵)
FC	<i>Fold Change</i>
FCS/FBS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf/bovine serum</i>)
FDR	Falscherkennungsrate (<i>false Discovery Rate</i>)
For	Vorwärts (<i>forward</i>) <i>Primer</i>
G	Guanin
g	Gramm
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i> (Plattform)
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293T (Zelllinie)
hsa-miR	humane microRNA
k (Präfix)	Kilo (10 ³)
kb	Kilobase
Korr.	Korrelation(koeffizient)
l	Liter
LARII	Luciferase Assay Reagenz II
LB-Medium	<i>Lysogeny-Broth-Medium</i>

Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Bedeutung
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
m (Präfix)	Milli (10 ⁻³)
m	Meter
M	Molar
m7G	7-Methylguanosin
Max	Maximum
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
Min	Minimum
miRISC	microRNA-beladener RISC
miRNA mimics	Synthetische miRNA-Moleküle
miRNA/miR	MicroRNA
miRnome	Gesamtheit der exprimierten miRNAs/miRNA-Spektrum
mRNA	Boten- (<i>messenger</i>) RNA
mut	Mutante/Mutierte Sequenz
n (Präfix)	Nano (10 ⁻⁹)
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFκB	NF-kappaB (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
nt	Nukleotide
OE-PCR	<i>Overlap extension PCR</i>
Oligo(dT) <i>Primer</i>	Oligomere Desoxythymidin <i>Primer</i>
ori	bakterieller Replikationsursprung
p (Präfix)	Piko (10 ⁻¹²)
p	p-Wert (Signifikanzwert)
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)

Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Bedeutung
piRNA	<i>Piwi-interacting</i> RNA
PLB	Lysepuffer (<i>passive lysis buffer</i>)
pMIR	pMIR-RNL-TK (Plasmid)
Pol	Polymerase
pre-microRNA	prä(<i>precursor</i>)-microRNA
pri-microRNA	primäre(<i>primary</i>)-microRNA
qPCR	quantitative PCR
R ²	Bestimmtheitsmaß
Ran-GTP	<i>Ras-related nuclear protein</i> -Guanosintriphosphat
RAP	Alkalische Phosphatase (<i>rapid alkaline phosphatase</i>)
RBC	Rote Blutzelle (<i>red blood cell</i>)
RBP	RNA-bindendes Protein
Rep	Replikat
Rev	Rückwärts (<i>reverse</i>) <i>Primer</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Medium
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
siRNA	<i>Small interfering</i> RNA
sncRNA	Kleine nicht-kodierende RNA (<i>small non-coding</i> RNA)
SOC-Medium	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> -Medium
SV40/P SV40/SV40 pA	Simian-Virus 40/SV40 Promotor/SV40-Polyadenylierungssignal
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
<i>Taq</i>	<i>Taq (Thermus aquaticus)</i> -Polymerase
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TRBP	TAR element binding protein

Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Bedeutung
tRNA	Transfer-RNA
T-Zelle/T-Lymphozyt	Thymus gereifter Lymphozyt
U	Unit
U	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
w/v	Massenprozent (<i>weight per volume</i>)
WBC	Weiße Blutzelle (<i>white blood cell</i>)
wt	Wildtyp
α	Anti (Antikörper)
Δ	Delta (Änderung/Differenzzeichen)
λ	Wellenlänge (Lamda)
μ (Präfix)	Micro (10^{-6})
ρ	Dichte (Rho)

1. Zusammenfassung

T-Zellen spielen eine unverzichtbare Rolle im Rahmen der adaptiven Immunabwehr (JANEWAY et al., 1975; MATTER, 1974; ZHU, 2018). Eine veränderte T-Zell-Aktivität wird im Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener schwerwiegender Erkrankungen diskutiert (CHEN, JOHN WHERRY, 2020; DORNMAIR et al., 2003; MOLON et al., 2016; TAN et al., 2020). Für die Regulation der T-Zell-Aktivierung scheint die Expression von microRNAs von zentraler Bedeutung zu sein (EICHMULLER et al., 2017; KOPP et al., 2013; LIU et al., 2013b; LORENZI et al., 2012). Als Biomarker für T-Zell gekoppelte Erkrankungen und als Instrument für die gezielten Manipulation der T-Zell-Funktion könnten microRNAs in Zukunft im diagnostischen und therapeutischen Bereich Anwendungen finden (COLAMATTEO et al., 2019; LONG et al., 2018). Umfangreiche Kenntnisse zur Expression und zur spezifischen Wirkungsweise von microRNAs sind dafür eine wesentliche Voraussetzung (EICHMULLER et al., 2017; GIRI et al., 2019; JI et al., 2016; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017). Die Ziele dieser Arbeit bestanden in der Erfassung, Quantifizierung und funktionellen Charakterisierung von microRNA-Expressionsveränderungen in der frühen 24 h Phase der humanen T-Zell-Aktivierung. Die Studie wurde an CD4+ T-Zellen durchgeführt, die den größten Anteil der T-Zell-Subtypen im menschlichen Blut bilden und von zentraler Bedeutung für die Effektivität der Immunantwort sind (LUCKHEERAM et al., 2012; TOLLERUD et al., 1989).

Als Ausgangspunkt der Analysen wurden detaillierte zeitaufgelöste Hochdurchsatz-Datensätze zur microRNA- und mRNA-Expression über die initialen 24 h der *in vitro* induzierten CD4+ T-Zell-Aktivierung erstellt. Auf Basis der umfassenden Zeitverlaufsdaten konnten 39 zentrale microRNAs mit deutlicher Expressionsveränderung im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses identifiziert werden. Hierbei konnte eine hohe technische und interindividuelle Reproduzierbarkeit der microRNA-Zeitverlaufsveränderungen gezeigt werden. Die Klassifizierung der zeitaufgelösten Expressionsprofile ermöglichte Rückschlüsse zu den Mechanismen, die zur Koordination der microRNA-Expression im Rahmen des frühen T-Zell-Aktivierungsprozesses beitragen könnten. Dazu zählt beispielsweise die Transkriptionskontrolle multipler microRNAs durch den Transkriptionsfaktor c-Myc.

Durch die Etablierung einer neuen Methodik zur Quantifizierung der microRNA-Expression konnte ein grundlegender Überblick über die aktivierungs-gekoppelten Expressionsänderungen für alle 815 detektierten microRNAs gewonnen werden. Für die zentral veränderte miR-155-5p wurde ein molekularer microRNA-Expressionsbereich zwischen $7,54 \times 10^4$ und $3,25 \times 10^6$ Molekülen pro Nanogramm zellulärer Gesamt-RNA ermittelt. Im Hinblick auf eine zukünftige therapeutische microRNA-Nutzung konnte somit ein Rahmen für eine physiologisch angepasste Dosierung gelegt werden (LAI et al., 2019; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017).

Um Einblicke in die Wirkungsweise von microRNAs zu gewinnen, wurden die regulatorischen Funktionen der miR-155-5p untersucht, indem *in silico* vorhergesagte Zielgene mit invers korrelierenden mRNA-Zeitverlaufsdaten anhand von dualen Luciferase-Reporter-Assays getestet wurden. Dabei konnte die microRNA-Zielgen-Interaktion für 17 von 19 getesteten Genen bestätigt und der regulatorische Einfluss der microRNA für ein breites Spektrum zellulärer Funktionen gezeigt werden. Als Hinweis auf mögliche kooperative microRNA-Funktionen im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses konnten durch die *in silico* Analyse von microRNA-Zielgen-Netzwerken drei zentral veränderte microRNA-Paare mit multiplen gemeinsamen Zielgenen identifiziert werden (let-7b-5p/miR-26a-5p, miR-17-5p/miR-20a-5p und miR-21-5p/miR-155-5p). Exemplarisch für das miR-21-5p/miR-155-5p-Paar konnte im Rahmen von dualen Luciferase-Assays ein synergistischer regulatorischer Effekt auf das *LEMD3*-Zielgen nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit geben Einblicke in die Dynamik und Wirkung der microRNA-Expression im Kontext des frühen CD4⁺ T-Zell-Aktivierungsprozesses und liefern eine umfassende Datengrundlage zur Aufklärung von microRNA-regulierten Signalnetzwerken sowie für die Entwicklung von microRNA-basierten Therapieansätzen.

Summary

Dynamics and functionality of microRNA expression within the early phase of human CD4+ T cell activation

T cells play an indispensable role for the adaptive immune defense (JANEWAY et al., 1975; MATTER, 1974; ZHU, 2018). An altered T cell activity is associated with the emergence of severe diseases (CHEN, JOHN WHERRY, 2020; DORNMAIR et al., 2003; MOLON et al., 2016; TAN et al., 2020). The expression of microRNAs appears to be critically important for the regulation of T cell activation (EICHMULLER et al., 2017; KOPP et al., 2013; LIU et al., 2013b; LORENZI et al., 2012). MicroRNAs bear high potential as future biomarkers for T cell related pathologies and as a tool for the targeted manipulation of T cells (COLAMATTEO et al., 2019; LONG et al., 2018). A fundamental understanding of the expression and functionality of microRNAs is a principal prerequisite to apply microRNAs in a future diagnostic and therapeutic context (EICHMULLER et al., 2017; GIRI et al., 2019; JI et al., 2016; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017). The objectives of this thesis were the detection, quantification and functional characterization of microRNA expression changes within the early 24 h phase of human T cell activation. The study was conducted on CD4+ T cells, which constitute the largest fraction of T cell subtypes in human blood and are central to the effectiveness of the immune response (LUCKHEERAM et al., 2012; TOLLERUD et al., 1989).

First, detailed time-resolved high-throughput datasets on microRNA and mRNA expression were determined during the initial 24 h of *in vitro* induced CD4+ T cell activation. Based on the comprehensive time-course data in context of the T cell activation process, 39 central microRNAs with distinct expression changes were identified and a very high technical and inter-individual reproducibility of the microRNA time-course changes was demonstrated. The classification of the time-resolved expression profiles allowed conclusions about the mechanisms that likely coordinate the microRNA expression during the early T cell activation process, as for example the transcriptional control of multiple microRNAs by the transcription factor c-Myc.

A newly implemented methodology to quantify the microRNA expression allowed to determine both the molecular range of microRNA expression and the activation-coupled expression changes for all of the 815 detected microRNAs. For the most prominently changed miR-155-5p a microRNA expression range between 7.54×10^4 and 3.25×10^6 molecules per nanogram of cellular total RNA was determined. These quantitative data constitute a basis to define a physiological dosage for a future therapeutic application of microRNAs (LAI et al., 2019; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017).

To gain further insights into the functionality of microRNAs, regulatory functions of miR-155-5p were characterized by the testing of target genes that were *in silico* predicted and showed inverse correlating mRNA time-course data. Dual luciferase reporter assays confirmed microRNA target interactions for 17 out of the 19 tested genes. The regulatory microRNA impact was demonstrated on a broad range of cellular functions. *In silico* analyses of microRNA-target networks identified three prominently changed microRNA pairs with multiple shared targets (let-7b-5p/miR-26a-5p, miR-17-5p/miR-20a-5p and miR-21-5p/miR-155-5p), indicating presumable cooperative microRNA functions in the context of the T cell activation process. Exemplary for the miR-21-5p/miR-155-5p pair, dual luciferase assays demonstrated a synergistic regulatory effect on the *LEMD3* target gene.

This thesis provides insights into the dynamics and functionality of microRNA expression during the early CD4⁺ T cell activation process and a comprehensive data basis for both the elucidation of microRNA regulated signaling networks and the development of microRNA-based therapeutic approaches.

2. Einleitung

2.1. Nicht-kodierende RNAs zur Kontrolle der Gen-Expression

Das menschliche, nukleäre Genom besteht aus mehr als drei Milliarden Basenpaaren (bp), die sich auf insgesamt 46 Chromosomen verteilen (MAKALOWSKI, 2001). Obwohl etwa 80 % des Genoms aktiv transkribiert werden, ist lediglich ein geringer Anteil von circa 3 % für die Kodierung von *messenger* Ribonukleinsäuren (*messenger ribonucleic acids*; mRNAs) verantwortlich und bildet somit die Grundlage für die Herstellung von Proteinen (CONSORTIUM, 2012). Der überwiegende Anteil wird als nicht-kodierende RNAs transkribiert. Diese können beispielsweise als tRNAs (Transfer-RNAs) und rRNAs (ribosomalen RNAs) an Prozessen wie der Translation beteiligt sein, aber auch als regulatorische RNAs entscheidenden Einfluss auf die Gen-Expression nehmen (DIAMANTOPOULOS et al., 2018; ROMANO et al., 2017). Eine zentrale Gruppe der regulatorischen RNAs bilden die kleinen nicht-kodierenden RNAs (*small non-coding RNAs*, sncRNAs) (COSTA et al., 2012). Diese besitzen eine Länge von etwa 20-30 Nukleotiden (nt) und sorgen als Bestandteil des *RNA-induced silencing complex* (RISC) durch ihre Assoziation mit Proteinen der Argonaut (Ago) Familie für eine reduzierte Expression ihrer Zielgene (CHOUDHURI, 2010; FAEHNLE, JOSHUA-TOR, 2007). Man spricht dabei vom Prozess der sogenannten RNA-Interferenz (FAEHNLE, JOSHUA-TOR, 2007). *PIWI-interacting RNAs* (piRNAs), *small interfering RNAs* (siRNAs) und microRNAs bilden die drei Hauptklassen der sncRNAs (COSTA et al., 2012; HUANG et al., 2013b).

Die Keimbahn spezifischen piRNAs gehen in der Regel aus langen, einzelsträngigen Transkripten von intergenischen, repetitiven Sequenzregionen hervor (GRIVNA et al., 2006; THOMSON, LIN, 2009). Durch die Regulation von transposablen Elementen sorgen sie für die genomische Integrität der Keimzellen (CZECH et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2017). Im Gegensatz dazu werden siRNAs enzymatisch auf Basis von langen doppelsträngigen RNAs (dsRNAs) generiert (COSTA et al., 2012; PARRISH et al., 2000). Diese können im Säuger genom beispielsweise durch bidirektionale Transkription oder die Transkription von *inverted repeats* entstehen (CHAPMAN, CARRINGTON, 2007; WATANABE et al., 2008; YANG, KAZAZIAN, 2006). Funktionell können endogene siRNAs sowohl dem zellulären Schutz vor Retrotransposons dienen, aber auch einen Beitrag zur Regulation proteinkodierender Gene leisten (OBBARD et al., 2009; TAM et al., 2008; WATANABE et al., 2008).

Eine weitere Klasse der sncRNAs bilden die microRNAs (miRNAs, miRs). Diese gelten durch ihren umfangreichen Einfluss auf die Expression proteinkodierender Gene und ihre differentielle Expression in Reaktion auf externe Stimuli als zentrale Regulatoren von zellulären Signalwegen (AVRAHAM, YARDEN, 2012). Untersuchungen weisen darauf hin, dass im menschlichen Genom mehr als 60 % der proteinkodierenden Gene durch miRNAs reguliert werden (FRIEDMAN et al., 2009).

2.2. MiRNAs: Biogenese, Einfluss auf zelluläre Signalprozesse und mögliche klinische Anwendung

MiRNAs bilden eine Gruppe der sncRNAs, welche die Expression ihrer Zielgene auf post-transkriptioneller Ebene regulieren (COSTA et al., 2012; HUANG et al., 2013b). Sie werden endogen durch genomische Loci kodiert, die sowohl in intergenischen Bereichen als auch in Exons oder Introns proteinkodierender Gene liegen und über eigene Promotoren verfügen können (DE RIE et al., 2017; KIM, KIM, 2007). Zudem können mehrere miRNA-Gene in Clustern vorliegen und gemeinsam als Polycistron transkribiert werden (HE et al., 2005; LEE et al., 2002; TANZER, STADLER, 2004; WANG et al., 2016b). Zurzeit geht man davon aus, dass das menschliche miRNA-Spektrum (*miRnome*) insgesamt 2654 reife miRNAs umfasst, die in 1917 Genen kodiert sind (KOZOMARA et al., 2019).

Durch Aktivität der RNA-Polymerase II, in einigen Fällen auch der RNA-Polymerase III, entsteht auf genomischer Grundlage zunächst ein primäres Transkript, die sogenannte pri-miRNA (Primäre miRNA) (BARTEL, 2004; BORCHERT et al., 2006; LEE et al., 2004). Diese kann eine Länge von mehr als tausend Nukleotiden aufweisen und wird durch ein 5'-7-Methylguanosin (m7G) sowie ein 3'-Polyadenylierungssignal stabilisiert (CAI et al., 2004). Sie enthält einen etwa 60-70 nt langen, haarnadelförmigen miRNA-Vorläufer (*precursor-miRNA*, pre-miRNA), der im Rahmen der kanonischen miRNA-Biogenese mit einem 2 nt-Überhang im 3'-Sequenzbereich vom übrigen Transkript getrennt wird (CAI et al., 2004; LEE et al., 2003). Die Reaktion wird enzymatisch über den nukleären *Microprocessor*-Komplex katalysiert, der aus der Ribonuklease (RNase) III Drosha und dem dsRNA-bindenden Protein DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8, auch als Pasha bezeichnet) besteht (DENLI et al., 2004; HAN et al., 2004; LEE et al., 2003). Durch Exportin 5 wird die pre-miRNA anschließend in einem RanGTP (*Ras-related nuclear protein*-Guanosintriphosphat) abhängigen Exportprozess vom Zellkern ins Cytoplasma transportiert (BOHNSACK et al., 2004). In einem weiteren

Prozessierungsschritt durch die RNase-III Dicer und das dsRNA-bindende TAR element binding protein (TRBP) wird im Folgenden der einzelsträngige *loop* von der Haarnadelstruktur entfernt, so dass ein etwa 22 nt langer microRNA-Doppelstrang mit 2 nt-Überhängen in den 3'-Sequenzbereichen erhalten bleibt (CHENDRIMADA et al., 2005; WINTER et al., 2009). Einer der beiden Stränge fungiert anschließend als sogenannter Leitstrang (WINTER et al., 2009). Dieser wird auf Grundlage seiner ursprünglichen Position in der pre-miRNA als 5p- oder 3p-Strang bezeichnet (DESVIGNES et al., 2015; KOZOMARA, GRIFFITHS-JONES, 2014). Dabei scheinen insbesondere miRNA-Stränge mit hohem Purin-Gehalt, einer geringen thermodynamischen Stabilität des 5'-Sequenzendes bzw. einem 5' Uracil eine erhöhte biologische Aktivität zu besitzen (HU et al., 2009; KHVOROVA et al., 2003). Funktionell ermöglicht der Leitstrang in Assoziation mit dem *RNA-induced silencing complex* (RISC) die zielgerichtete Bindung des Ribonukleoprotein-Komplexes an miRNA-spezifische Bindestellen, die in der Regel in der 3'-untranslatierten Region (3' UTR) von mRNAs liegen (GREGORY et al., 2005; NAKANISHI, 2016). Die Watson-Crick-Bindung an die revers-komplementären Bindestellen wird dabei über die *seed*-Region vermittelt, die am 5'-Ende der miRNA durch die Nukleotide zwei bis acht gebildet wird (FRIEDMAN et al., 2009; GARZON et al., 2009; GRIMSON et al., 2007). Die RISC-Bindung induziert im Folgenden den Abbau oder die Destabilisierung der Ziel-mRNA oder kann zu einer Inhibition der Translation führen, so dass es letztlich zu einer Reduktion der endogenen Menge des jeweiligen Proteins kommt (BAUMJOHANN, ANSEL, 2013; WINTER et al., 2009) (**Abbildung 1**).

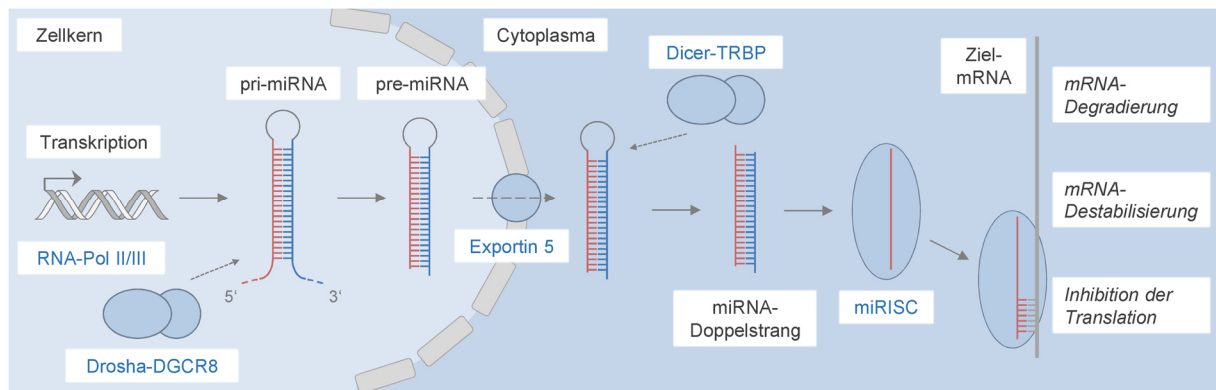


Abbildung 1: Schematischer Überblick zur miRNA-Biogenese.

Die primäre miRNA (pri-miRNA) wird durch die RNA-Polymerase II oder III (RNA-Pol II/III) transkribiert und anschließend durch den Drosha-DGCR8-Komplex zur haarnadelförmigen Vorläufer-miRNA (*precursor*-, pre-miRNA) prozessiert. Diese wird über Exportin-5 vom Nucleus ins Cytoplasma exportiert, wo sie in einem weiteren Prozessierungsschritt durch den Dicer-TRBP-Komplex zu einem etwa 22 nt langen miRNA-Doppelstrang geschnitten wird. Einer der beiden Stränge assoziiert als reife miRNA mit dem *RNA-induced silencing complex* (miRNA-beladener RISC, miRISC) und ermöglicht über ihre spezifische *seed*-Region dessen Bindung an die Ziel-mRNAs der miRNA. Dies führt zur Inhibition der Translation, zur Destabilisierung oder zur Degradierung der mRNA und somit schließlich in einer Reduktion der endogenen Proteinmenge. (*Eigene Darstellung*)

Da eine miRNA in der Regel an der Regulation mehrerer Zielgene beteiligt ist und Zielgene durch den Einfluss mehrerer miRNAs reguliert werden können, ergeben sich komplexe regulatorische Netzwerke (BAUMJOHANN, ANSEL, 2013; GRIMSON et al., 2007). Auf Grundlage von kooperativen miRNA-Bindestellen kann es bei gleichzeitiger Expression von bestimmten miRNAs zu einer veränderten Wirkung auf gemeinsame Zielgene und somit zu einer Verschiebung von miRNA-regulierten Netzwerken kommen (GRIMSON et al., 2007; LAI et al., 2019). Zudem kann die Expression von miRNAs sowohl auf transkriptioneller Ebene, zum Beispiel durch das Vorhandensein von Transkriptionsfaktoren, als auch im Rahmen der weiteren Prozessierung, zum Beispiel durch *RNA-Editing*, dynamisch beeinflusst werden (GULYAEVA, KUSHLINSKIY, 2016; YANG et al., 2006). So zeigen bestimmte miRNAs in Abhängigkeit des Gewebetyps, des zellulären Zustandes oder im Zusammenhang mit der Entstehung von Erkrankungen veränderte Expressionsraten (AVRAHAM, YARDEN, 2012; GULYAEVA, KUSHLINSKIY, 2016). Die Charakterisierung von veränderlichen miRNA-Expressionsmustern ist auf Basis dessen von zentraler Bedeutung für das grundlegende Verständnis von zellulären Signalwegen und für die Erforschung von Erkrankungen (RUPAIMOOLE, SLACK, 2017; SALVI et al., 2019; SEVEN et al., 2014). Auch für den klinischen Diagnostik-Bereich könnte die Identifizierung von krankheitsassoziierten miRNA-Expressionsveränderung von großem Nutzen sein. Dabei könnten veränderte microRNAs mithilfe von molekularbiologischen Verfahren detektiert und künftig als sogenannte Biomarker zum klinischen Krankheitsnachweis, zur prognostischen Einschätzung oder zur Bewertung von Therapieerfolgen herangezogen werden (DIENER et al., 2019; SHIGEYASU et al., 2017; STRIMBU, TAVEL, 2010).

Aufgrund ihres umfangreichen Einflusses auf zelluläre Signalwege (FRIEDMAN et al., 2009), könnten miRNAs zudem von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von innovativen Therapien sein (HANNA et al., 2019; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017). So könnte die gezielte Applikation von miRNA-Inhibitoren (antimiRs) oder synthetischen miRNAs (miRNA mimics) genutzt werden, um beispielsweise viralen Infektionen oder dem Wachstum von Tumoren entgegenzuwirken (HONG et al., 2020; JANSSEN et al., 2013; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017). Erste klinische Studien zur therapeutischen Anwendung von miRNAs sind jedoch noch von gravierenden Nebenwirkungen begleitet (HONG et al., 2020). Zentrale Herausforderungen für die Etablierung von miRNA-basierten Therapien bestehen daher in der Auswahl von potenten miRNA-Kandidaten für den therapeutischen Einsatz, der Charakterisierung spezifischer miRNA-Funktionen zur Vermeidung von ungewollten Nebeneffekten und in der Bestimmung einer nicht-toxischen therapeutischen Dosierung (RUPAIMOOLE, SLACK, 2017). Ein Fokus in der Entwicklung von miRNA-basierten Therapieansätzen liegt beispielsweise auf der miRNA-basierten Manipulation der Immunfunktion (GIRI et al., 2019; JI et al., 2016; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017).

2.3. Das Immunsystem

Das Immunsystem sorgt für die Abwehr von intra- und extrazellulären Pathogenen. Dabei werden sowohl pathogene Mikroorganismen (z.B. Bakterien und Viren) aber auch eine Reihe toxischer Substanzen oder körpereigene geschädigte Zellen beseitigt, um so die normale Körperfunktion zu erhalten (CHAPLIN, 2010; NICHOLSON, 2016; SPIERING, 2015). Grundlegend kann zwischen angeborener und adaptiver (erworbener) Immunantwort unterschieden werden.

Das angeborene Immunsystem ermöglicht eine schnelle, aber generalisierte Form der immunologischen Abwehr (COOPER, ALDER, 2006; MARSHALL et al., 2018). Neben physikalischen Abwehrmechanismen, zum Beispiel durch epitheliale Barrieren, beinhaltet es Zellen wie die Granulozyten, natürlichen Killerzellen, Makrophagen und die dendritischen Zellen (CHAPLIN, 2010; DRANOFF, 2004). Diese erkennen Pathogene mithilfe von Erkennungsrezeptoren anhand von konservierten molekularen Mustern (PAMPs/DAMPs, *pathogen-associated/ damage-associated molecular patterns*). Dazu zählen beispielsweise Lipopolysaccharide der bakteriellen Zelloberfläche, aber auch Moleküle, die durch Schäden an körpereigenen Zellen entstehen (JANEWAY, MEDZHITOV, 2002; NEWTON, DIXIT, 2012). Die meisten Zellen des angeborenen Immunsystems sorgen durch Phagozytose, das heißt durch vesikuläre Aufnahme der Pathogene in Verbindung mit intrazellulärer chemischer Lyse, für die schnelle Beseitigung der Infektionsquelle (CHAPLIN, 2010; SPIERING, 2015). Zudem spielen lösliche Faktoren wie Immunzell regulatorische und attrahierende Zytokine, antimikrobielle Peptide und die Komplement-Proteine eine wichtige Rolle (DRANOFF, 2004; MOSER, WILLIMANN, 2004; NEWTON, DIXIT, 2012). Letztere können beispielsweise an die Oberfläche von Pathogenen binden, um deren Phagozytose zu erleichtern oder die direkte Lyse von Bakterienzellen induzieren (MATHERN, HEEGER, 2015).

Im Zusammenhang mit der Evolution der Kiefermäuler (Gnathostomata) kam es neben dem angeborenen Immunsystem zur Entwicklung des adaptiven Immunsystems (COOPER, ALDER, 2006). Dieses ermöglicht die Erkennung von Pathogenen durch ein umfangreiches Repertoire an Antigen-spezifischen Rezeptoren (YATIM, LAKKIS, 2015). Zur Generierung einer hohen Diversität dieser Oberflächenrezeptoren finden bei der Entwicklung der adaptiven Immunzellen umfangreiche genetische Re-Arrangements statt (YATIM, LAKKIS, 2015). Bei Kontakt mit dem passenden Antigen kommt es zunächst zur klonalen Expansion der spezifischen Zelle, was im Vergleich zur angeborenen Immunität eine zeitlich verzögerte Wirkung, jedoch auch eine deutlich höhere Spezifität mit sich bringt (AKIRA et al., 2006; CHAPLIN, 2010). Zudem zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch die Ausbildung des sogenannten immunologischen Gedächtnisses aus (CHAPLIN, 2010). In Form von pathogen-spezifischen überdauernden Zellformen sorgt dieses bei einer erneuten Infektion des gleichen Erregers für eine schnellere

immunologische Reaktion und damit eine effektivere Immunabwehr (CHAPLIN, 2010; MARSHALL et al., 2018; MOND et al., 1972). Die Zellen der adaptiven Immunantwort entwickeln sich aus gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen, die in den primären lymphatischen Organen zur reifen Zellform der sogenannten B- und T-Lymphozyten heranreifen (B- und T-Zellen) (BONILLA, OETTGEN, 2010). B-Zellen, reifen im Knochenmark (*bone marrow*), differenzieren nach Kontakt mit dem passenden Antigen zur sogenannten Plasmazelle und produzieren antigenspezifische Antikörper (HOFFMAN et al., 2016a; OLLILA, VIHINEN, 2005). Diese bilden den humoralen Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Sie aktivieren beispielsweise das Komplement-System, erleichtern die Pathogen-Phagozytose und verhindern die Infektion von Körperzellen (HOFFMAN et al., 2016a; OLLILA, VIHINEN, 2005). Im Gegensatz dazu reifen die sogenannten T-Zellen in der Thymus-Drüse heran und bilden die zelluläre Komponente des adaptiven Immunsystems (BONILLA, OETTGEN, 2010).

2.4. T-Zellen als wichtiger Bestandteil der adaptiven Immunantwort

T-Zellen spielen eine zentrale Rolle für die adaptive Immunantwort. Sie erfüllen dabei ein breites Spektrum unterschiedlicher Funktionen. Diese reichen von der umfangreichen Regulation anderer Immunzellen bis hin zur direkten Eliminierung infizierter oder entarteter Zellen (JANEWAY et al., 1975; MATTER, 1974; ZHU, 2018). Im inaktiven Zustand sind T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen, wie beispielsweise den Lymphknoten, lokalisiert. Zudem zirkulieren sie über Blut und Lymphe im Körper, um eine permanente immunologische Überwachung zu gewährleisten (HUNTER et al., 2016). Im Falle einer Infektion werden T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert (*antigen presenting cells*, APCs) zu denen beispielsweise die dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) gehören (AUSTYN et al., 1983; BEVAN, 2004; SMITH-GARVIN et al., 2009) (**Abbildung 2**). Dabei spielen vor allem die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit antigenpräsentierenden *Major Histocompatibility* Komplexen (MHC) sowie ein co-stimulatorisches Signal durch die Interaktion des CD28-Rezeptors mit B7-co-stimulatorischen Molekülen (CD80 bzw. CD86) auf der Oberfläche der APC eine entscheidende Rolle (SHARPE, ABBAS, 2006). Die Aktivierung der naiven T-Zelle durch die APC führt anschließend zur Proliferation und Differenzierung der Zelle, gefolgt von einer Migration zum infizierten Gewebe, wo die Effektor-Zelle schließlich ihre Funktion erfüllt (BONILLA, OETTGEN, 2010; POLLIZZI, POWELL, 2014). Im Anschluss an die Infektion bleiben einige Zellen als pathogen-spezifische Gedächtniszellen erhalten und bilden somit einen Teil des immunologischen Gedächtnisses (MARSHALL et al., 2018; MOND et al., 1972).

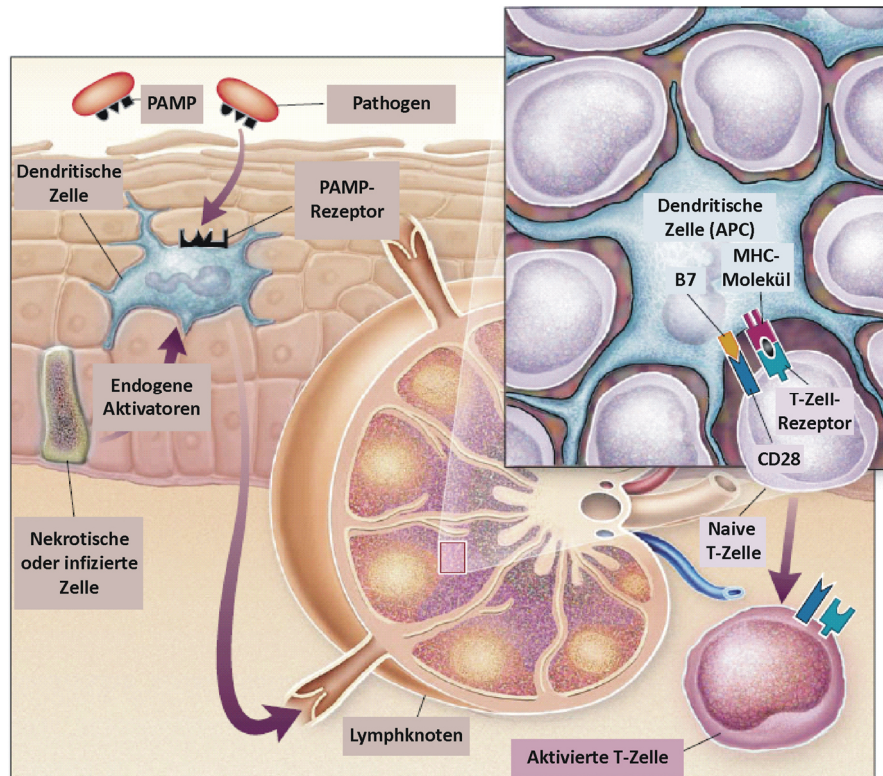


Abbildung 2: T-Zell-Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen.

Im Falle einer Infektion werden Pathogene mithilfe von Erkennungsrezeptoren anhand von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*pathogen-associated molecular patterns/PAMPs*) bzw. endogenen Molekülen von geschädigten Zellen erkannt und von antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie beispielsweise den dendritischen Zellen, aufgenommen. Diese wandern anschließend in die Lymphknoten und sorgen durch Rezeptor-Interaktionen für die Aktivierung von T-Zellen. Für die Aktivierung der T-Zelle spielen die Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor und antigenpräsentierenden *Major Histocompatibility* Komplexen (MHC) sowie die Co-Stimulation des CD28-Rezeptors durch B7-Moleküle auf der Oberfläche der APC eine entscheidende Rolle. Die Aktivierung der naiven T-Zelle führt anschließend zur Proliferation und Differenzierung der Effektor-T-Zelle, die in das infizierte Gewebe einwandert und dort durch die Produktion von Zytokinen oder die direkte Eliminierung infizierter und entarteter Zellen entscheidend zur effektiven Immunabwehr beiträgt.

(Quelle: *Reproduced with permission from (DELVES, ROITT, 2000), Copyright Massachusetts Medical Society. The figure was modified/translated / die Abbildung wurde modifiziert/übersetzt*)

Grundlegend lassen sich T-Zellen funktionell mithilfe spezifischer Oberflächen-Glykoproteine unterscheiden (GOLUBOVSKAYA, WU, 2016; MASOPUST et al., 2007; SHARPE, ABBAS, 2006). CD8⁺ (*Cluster of Differentiation 8 positive*) Rezeptoren binden an Antigene, die aus dem endogenen Zellkompartiment stammen und über MHC-Moleküle der Klasse I an der Zelloberfläche aller nukleären Körperzellen präsentiert werden (HEWITT, 2003).

Dabei wirken CD8⁺ Effektor-T-Zellen hauptsächlich als zytotoxische Zellen, die virus-infizierte oder entartete Zellen über die Präsentation von nicht-körperigen Antigenen erkennen und anschließend eliminieren können (ROCK et al., 2016). CD4⁺ Rezeptoren hingegen binden an Antigene, die von phagozytierenden APCs aus dem extrazellulären Raum im Umfeld der Infektion aufgenommen und nach ihrer Prozessierung über Klasse II MHC-Moleküle auf deren Oberfläche präsentiert werden (ROCK et al., 2016). CD4⁺ Effektor-T-Zellen wirken funktionell vor allem als T-Helferzellen (T_H-Zellen) (BIERER et al., 1988; GOLUBOVSKAYA, WU, 2016). Durch den Einfluss von Zytokinen im Umfeld der differenzierenden CD4⁺ T-Zelle können dabei verschiedene T_H-Subpopulationen entstehen, die wiederum spezifische Zyto- und Chemokine sezernieren, um andere Immunzellen zur Infektion zu rekrutieren oder deren Aktivität zu regulieren (DONG, 2006; GOLUBOVSKAYA, WU, 2016; ZHU, PAUL, 2008). Eine stringente Regulation der T-Zell-Aktivität ist entscheidend für die effektive Funktionsweise des Immunsystems. Eine verstärkte Aktivität von T-Zellen steht beispielsweise im Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, während bei Krebserkrankungen die T-Zell-Aktivität häufig unter Einfluss der Krebszellen inhibiert wird (WANG et al., 2017; ZOU, 2005). Für die Regulation der T-Zell-Funktionalität spielen miRNAs eine herausragende Rolle (BAUMJOHANN, ANSEL, 2013; RODRIGUEZ-GALAN et al., 2018; SONKOLY et al., 2008).

2.5. Bedeutung von miRNAs für die Funktion von T-Zellen

Der Einfluss von miRNAs auf die T-Zell-Funktion konnte bereits in zahlreichen Studien belegt werden (BAUMJOHANN, ANSEL, 2013; RODRIGUEZ-GALAN et al., 2018; SONKOLY et al., 2008). Anhand von *Gen-Knockout*-Experimenten konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass bei einer Störung der miRNA-Biogenese die T-Zell-Aktivierung zu einer abnormen Zytokin-Produktion bis hin zum Absterben der Zelle führen kann (BAUMJOHANN, ANSEL, 2013; CHONG et al., 2008; MULJO et al., 2005). Zudem konnten immunregulatorische Moleküle als Ziele der miRNA-basierten Regulation identifiziert werden (RODRIGUEZ-GALAN et al., 2018). So kann die Expression bestimmter miRNAs die T-Zell-Aktivität sowohl fördern als auch inhibieren (PODSHIVALOVA, SALOMON, 2013; RODRIGUEZ-GALAN et al., 2018). Zugleich sorgen *feedback loops* zwischen miRNAs und miRNA-Zielgenen für die Adaptivität der T-Zell-Signalwege (YANG et al., 2012). Prozesse wie die Proliferation, die Differenzierung und Funktionalität der Effektor-Zellen sowie die zelluläre Viabilität scheinen ebenso durch die miRNA-Expression beeinflusst zu werden (BAUMJOHANN, ANSEL, 2013).

Veränderte miRNA-Expressionsraten und eine damit verbundene veränderte T-Zell-Funktionen stehen nachweislich im Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und T-Zell-Lymphomen (KOPP et al., 2013; LORENZI et al., 2012). Darüber hinaus scheinen miRNAs involviert zu sein, wenn es bei der Pathogenese verschiedenster Krebsarten zu einer Ineffektivität der anti-Tumor Immunantwort kommt (DIENER et al., 2018; EICHMULLER et al., 2017; LIU et al., 2013b). Auf Basis dessen könnten miRNAs künftig als Biomarker für T-Zell gekoppelte Erkrankungen oder als Instrument für die gezielten Manipulation der T-Zell-Funktion dienen und somit zum Bestandteil von immuntherapeutischen Ansätzen werden (COLAMATTEO et al., 2019; LONG et al., 2018). Dabei könnten mithilfe von miRNA mimics oder anti-miRs gezielt immunfördernde oder immunhemmende Wirkungen erzielt werden (GIRI et al., 2019; JI et al., 2016; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017).

2.6. Wissenschaftlicher Ausgangspunkt: MiRNA-Expression im Rahmen der T-Zell-Aktivierung

Wie bereits angesprochen sind T-Zellen im Rahmen der adaptiven Immunantwort von zentraler Bedeutung für die Abwehr von Infektionen und die Eliminierung geschädigter oder entarteter Körperzellen (JANEWAY et al., 1975; MATTER, 1974; ZHU, 2018). Für die Funktionsweise von T-Zellen scheint die koordinierte Expression von regulatorischen miRNAs eine entscheidende Rolle zu spielen (EICHMULLER et al., 2017; KOPP et al., 2013; LIU et al., 2013b; LORENZI et al., 2012). Gegenstand der aktuellen molekularbiologischen Forschung sind daher die Identifizierung und funktionellen Charakterisierung von miRNAs im Zusammenhang mit der T-Zell-Aktivität (EICHMULLER et al., 2017; GIRI et al., 2019; JI et al., 2016). Aufgrund der Dynamik von miRNA-regulierten Prozessen, können insbesondere zeitaufgelöste Datenreihen wichtige Informationen liefern, die es ermöglichen Rückschlüsse über die kausalen Zusammenhänge zwischen der Expression von miRNAs, der Regulation von miRNA-Zielgenen und dem folgenden Einfluss auf die Zellfunktion zu ziehen (BAR-JOSEPH et al., 2012; JAYASWAL et al., 2009; O'BRIEN et al., 2018).

Anhand des aktuellen Wissensstandes geht die T-Zell-Aktivierung mit einer koordinierten Umstrukturierung der miRNA-Expression einher (BRONEVETSKY et al., 2013; SANDBERG et al., 2008). Dazu bilden bisherige Zeitverlaufsanalysen vor allem die Abläufe zwischen einem und mehreren Tagen nach der T-Zell-Stimulation ab (RODRIGUEZ-GALAN et al., 2018). Untersuchungen, welche die ersten 24 h der Aktivierungsphase beinhalten, sind aktuell allerdings auf die Analyse weniger Zeitpunkte limitiert (BRONEVETSKY et al., 2013). In diesem Zeitraum finden jedoch zahlreiche funktionelle Veränderungen statt, die mit dem Übergang vom Ruhezustand in die Zellteilungsphase einhergehen (HESS et al., 2004; JELLEY-GIBBS et al., 2000; LONDON et al., 2000).

Zudem basieren viele der bisherigen Erkenntnisse zum T-Zell-Aktivierungsprozess auf Untersuchungen an Mäusen (RODRIGUEZ-GALAN et al., 2018). Mäuse weisen im Vergleich zum Menschen allerdings zahlreiche Unterschiede in der Strukturierung von T-Zell-Signalwegen auf (MESTAS, HUGHES, 2004; PODSHIVALOVA, SALOMON, 2013; SEOK et al., 2013). Daher können entsprechende Ergebnisse zur miRNA-Expression nur eingeschränkt auf den Menschen übertragen werden.

Somit könnten zeitaufgelöste Daten über den initialen 24 h Zeitraum der menschlichen T-Zell-Aktivierung wichtige neue Informationen über die Dynamik, die regulatorische Bedeutung und die Wirkung der miRNA-Expression liefern und somit künftig auch zu einem besseren Verständnis von T-Zell assoziierten Erkrankungen beitragen (FERNANDES, 2017; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017). Zudem könnten miRNAs für mögliche Interventionen in der initialen Phase der T-Zell-Aktivierung bestimmt werden, um damit die Entwicklung innovativer Immuntherapeutika voranzutreiben (GIRI et al., 2019; JI et al., 2016).

2.7. Zielsetzung

Die initiale 24-Stunden-Phase der T-Zell-Aktivierung ist von umfangreichen transkriptionellen Veränderung und der Umstrukturierung zellulärer Signalprozesse geprägt (HESS et al., 2004; ULLMAN et al., 1990). Eine Schlüsselrolle bei der Steuerung dieser Prozesse spielen miRNAs (EICHMULLER et al., 2017; KOPP et al., 2013; LIU et al., 2013b; LORENZI et al., 2012). Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der detaillierten Erfassung, Quantifizierung und funktionellen Charakterisierung von miRNA-Expressionsveränderungen im Zusammenhang mit den ersten 24 h der humanen T-Zell-Aktivierung. Dabei ließen sich folgende Teilziele definieren:

1) Es sollten zeitaufgelöste Datensätze zur miRNA- und mRNA-Expression für die ersten 24 h der T-Zell-Aktivierung erstellt werden. Die Untersuchungen sollten an CD4⁺ T-Zellen von zwei gesunden Spendern mit gleichem Geschlecht und vergleichbarem Alter durchgeführt werden. Nach *in vitro* Aktivierung, sollten Zeitverlaufsproben in Intervallen von 2 h gesammelt und die zeitaufgelösten RNA-Expressionsprofile durch Hochdurchsatz-Analysen mithilfe des Microarray-Verfahrens ermittelt werden. Dabei sollte für jeden Spender und für jeden Zeitpunkt die RNA aus drei separat aktivierten Zellproben analysiert werden.

2) Anhand von Expressionsveränderungen sollten zentrale miRNAs im Zusammenhang mit dem T-Zell-Aktivierungsprozess identifiziert werden. Für exemplarische miRNAs sollten die zugehörigen Expressionsmuster auf Grundlage von weiteren Spendern und mit einer unabhängigen Nachweismethodik (Taqman-Assays) validiert werden. Die Expressionsdynamik der identifizierten miRNAs sollte mittels *Cluster*-Analyse durch die Gruppierung von vergleichbaren miRNA-Zeitverlaufsmustern aufgeschlüsselt werden.

3) Die regulatorische Funktion ausgewählter miRNAs sollte im Zusammenhang mit dem T-Zell-Aktivierungsprozess untersucht werden. MiRNA-Zielgen-Beziehungen sollten dabei unter Einbezug der mRNA-Zeitverlaufsdaten und mithilfe von dualen Luciferase-Assays nachgewiesen sowie funktionell interagierende miRNA-Paare auf Grundlage von gemeinsamen Zielgenen identifiziert werden.

4) Um eine quantitative Auswertung der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten vor dem zellphysiologischen Hintergrund des T-Zell-Aktivierungsprozesses zu ermöglichen, sollte eine neue Methodik zur Eichung des verwendeten Microarray-Analysesystems etabliert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Übersicht verwendeter Materialien

Die Verwendung weiterer Materialien ist im Methodenteil an entsprechender Stelle beschrieben.

3.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
2-Propanol (ROTISOLV ≥99,95 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Agar (Bacto™)	Becton Dickinson and Company (BD)	Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonukleotide (dNTPs; dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Als Arbeitslösung zu je 10 mM)	F. Hoffmann-La Roche AG	Basel, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Doppelt deionisiertes Wasser (ddH ₂ O)	Hauseigene Anlage (siehe unter 3.1.7. Laborgeräte)	
Ethanol (99.8+ % Fisher Chemical)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Ethidiumbromid-Lösung (1 %; 10 mg/ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Gel Loading Dye Purple (6x) (für Agarose-Gel)	New England BioLabs GmbH	Frankfurt am Main, Deutschland
Glucose	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Hefe Extrakt (Bacto™)	Becton Dickinson and Company (BD)	Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Nuklease freies Wasser (Invitrogen)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Trichlormethan (Chloroform)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Tris(-hydroxymethyl-Aminomethan)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland

3. Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Trypton (Bacto™)	Becton Dickinson and Company (BD)	Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
UltraPure Agarose (Invitrogen™)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

3.1.2. Puffer- und Lösungsrezeptur

Bezeichnung	Komponenten	Mengenangabe
Ethidiumbromid-Lösung	Ethidiumbromid	10 mg/ml mit ddH ₂ O
50x TAE-Puffer pH 8,8 (Arbeitslösung: 1:50 v/v in ddH ₂ O)	Essigsäure	1 M
	EDTA	50 mM
	Tris-Base	2 M
LB (<i>Lysogeny Broth</i>)-Medium (Bakterielle Zellkultur)	Trypton	10 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	Agar (Nur bei Kulturplatten)	(15 g)
	NaCl	10 g
	ddH ₂ O	ad 1.000 ml

3.1.3. DNA-Größenstandard

Als DNA-Größenstandard bei der Agarosegelelektrophorese wurde die „Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder“ der Firma New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet (**Abbildung 3**). Die enthaltenen Referenz-Fragmente repräsentieren dabei folgende Basenpaar(bp)-Längen: 10.002, 8.001, 6.001, 5.001, 4.001, 3.001, 2.017, 1.517, 1.200, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500/517, 400, 300, 200 und 100 bp.

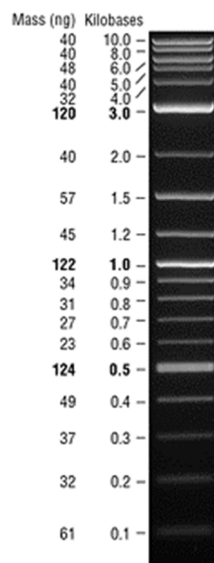


Abbildung 3: DNA-Fragmentgrößen der Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder.

Dargestellt nach der elektrophoretischen Auftrennung und Ethidiumbromid-Färbung in einem 1 %-igen Agarosegel. (Quelle: Hersteller-Abbildung, New England BioLabs GmbH)

3.1.4. Oligonukleotid-Primer

Für die Synthese des kodierenden (*Forward*; For) und des nicht-kodierenden (*Reverse*; Rev) Stranges der jeweiligen Matrize wurden im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion spezifische Oligonukleotid-*Primer* verwendet.

Die Sequenzen der verwendeten Klonierungs-*Primer* zur Amplifikation von 3'UTR-Sequenzen vorhergesagter miRNA-Zielgene sind nachfolgend in **Tabelle 1** zusammengefasst. Um im Rahmen der Klonierung die gerichtete Insertion der amplifizierten Sequenzen in den Zielvektor zu ermöglichen (DELIDOW, 1997), wurden zusätzlich Restriktionsschnittstellen der Enzyme *SpeI* und *SacI* oder *SacI* und *NgoMIV* an die Sequenz-Enden der *Primer* angefügt.

3. Material und Methoden

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer zur Amplifikation von 3'UTR-Sequenzen vorhergesagter miRNA-Zielgene.

Die dargestellten *Primer* wurden im Rahmen der Klonierung von 3'UTR-Reporterkonstrukten verwendet. Dabei wurden mithilfe der *Primer*-Sequenzen Restriktionsschnittstellen der Enzyme *SpeI* (*Forward*-, *For-Primer*) und *SacI* (*Reverse*-, *Rev-Primer*) an die Randbereiche der amplifizierten 3'UTR-Sequenzen angefügt. Wegen der Größe der Sequenz und dem Vorhandensein mehrerer vorhergesagter miRNA-Bindestellen wurden zwei Teil-Konstrukte (*KDM5B_1* & *KDM5B_2*) der *KDM5B*-3'UTR erstellt. Aufgrund einer *SpeI*-Schnittstelle innerhalb der zu klonierenden Sequenz wurden im Falle der *IL1RAP*-3'UTR *SacI*- (*For*) und *NgoMIV*-Schnittstellen (*Rev*) an die *Primer*-Sequenzen angefügt.

Mögliches miRNA Zielgen	Klonierungs-Primer (For) (mit <u>Restriktionsschnittstelle</u>) (5'→3')	Klonierungs-Primer (Rev) (mit <u>Restriktionsschnittstelle</u>) (5'→3')
<i>ADD3</i>	GACTAGTTTTAATTAGCTCTGCCCTC	GAGCTCGGGACATGTTTCCAACAAATC
<i>CYP2U1</i>	GACTAGTGCTTAAAGGTGATAAATCAGTG	CGAGCTCCAAGAACAGACTTCTTCTC
<i>DDX17</i>	GACTAGTGATTTCATTCACAATGCAG	CGAGCTCCTAAGAATAGTAACATAGC
<i>EZH1</i>	GACTAGTCTTAGCCAGAGAGGGAGAAC	CGAGCTCGTAAGAGGCAGCTGGGTCAG
<i>HERC3</i>	GACTAGTGAATGTGTTGCACTCTGCTG	CGAGCTCGAGGAAGGTTGAGCATGTC
<i>IFT80</i>	GACTAGTGCTGTGTATTTAGTGTAAG	CGAGCTCCATACATAATCCCATATCTATG
<i>IL1RAP</i>	CGAGCTCCTTAGTGCCCTTGAGAGTTGC	GGCCGGCCTATTCCCTGTTTGCTAAAG
<i>JMY</i>	GACTAGTCATTCAAGATTGGTTCTGATTC	CGAGCTCCTGCATCCCTATGATTGAATC
<i>KDM5B_1</i>	GACTAGTCTTAATGTAATTCAGGACTCC	CGAGCTCCATCAGTGACACTAGAAAC
<i>KDM5B_2</i>	GACTAGTGTGTTAGCTGTGAAGCTGG	CGAGCTCGTATGTAGTTAGTCTGATAATG
<i>LAT2</i>	GACTAGTCTGCCTTCCAAGGACCATTTC	CGAGCTCGGCAACATTTCTGACTCAAGG
<i>LEMD3</i>	GACTAGTGTAGTCCCATAATTTCTTGTG	CGAGCTCGGCACAAAGCAACAGTCAATC
<i>LDLRAP1</i>	GACTAGTCTTAGAGACTAAGGGCAGC	CGAGCTCCAGAGCAGGGGCAAGGAAG
<i>RASA3</i>	GACTAGTCATAGACAAGTGGCGCTGG	GAGCTCCTGGAGAAGCTGGAGCCC
<i>RXRA</i>	GACTAGTGCAAGTACATAAGGACCCTC	CGAGCTCCGCTCATATTTTGTCTCTCTC
<i>S100B</i>	GACTAGTGTAACAGAGACGGTCATGC	CGAGCTCGACTTGAATCGCATGGGTC
<i>SH3BP4</i>	GACTAGTCAGCTCATTCTTTCTGAG	GAGCTCGAATTGTGTGTCCTGGTTC
<i>SORL1</i>	GACTAGTGACAAGTAATTCCTGGGG	CGAGCTCCATAACAAGAGTCTTTAAATGAG
<i>STARD8</i>	GACTAGTGAGAAGAGAATCGCATGAGTAG	CGAGCTCTAAAGTGCATCTCTGGTAATGCT
<i>TADA2B</i>	GACTAGTCGTCTGACCAGTTGGCTGG	CGAGCTCCCAAAGTGGATCCTGGC
<i>TAF7</i>	GACTAGTGAAGTATTTAATTTTCAG	CGAGCTCCAGATGCTTTTATTTATTG

3. Material und Methoden

Um bei der Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion transformierte Bakterien auf das Vorhandensein der Plasmid-DNA und die erwartete Größe des klonierten 3'UTR-*Inserts* zu testen, wurden Oligonukleotid-*Primer* zur Amplifikation der *Polylinker*-Region des pMIR-RNL-TK-Reporterplasmides (**Tabelle 2**) verwendet.

Zur gezielten Veränderung von vorhergesagten miRNA-Bindestellen in den 3'UTR-Sequenzen potenzieller Zielgene wurden die gewünschten Sequenzveränderungen mithilfe von Mutagenese-*Primern* in die Zielsequenzen eingefügt (**Tabelle 3**).

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-*Primer* zur Amplifikation der Polylinker-Region des pMIR-RNL-TK-Reporterplasmids (pMIR-*Primer*).

pMIR- <i>Primer</i> (For) (5'→3')	pMIR- <i>Primer</i> (Rev) (5'→3')
GAAGTACCGAAAGGTCTTACCG	CCAAGCTAGCGGCCGCATACAA

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotid-*Primer* zur Mutagenese vorhergesagter Bindestellen in den 3'UTR-Sequenzen potenzieller miRNA-Zielgene.

Vorhergesagte miRNA-Bindestellen wurden in entsprechender Anzahl durch Schnittstellen des Restriktionsenzym *NruI* (Unterstrichen) mit zusätzlich angefügten Basenpaaren ersetzt. Da bei der *STARD8*-3'UTR die vorhergesagte Bindestelle im Randbereichen der klonierten Sequenzen lag, wurde der Mutagenese-*Primer* an die Sequenz des ursprünglichen Klonierungs-*Primers* angefügt und die mutierte Gesamt-Sequenz durch Kombination mit dem Klonierungs-*Primer* (For) in einer einzelnen PCR erstellt.

Zielgen- 3'UTR	Mutagenese- <i>Primer</i> (For) (5'→3')	Mutagenese- <i>Primer</i> (Rev) (5'→3')
<i>ADD3</i>	CCATTGTTTCAGTGGCACGTGA CAGAATGCTTTAAAACTTCTA AGACAAGAATCTATTCGCGAGG TATACACTGGCAC	GTGCCAGTGTATACCTCGCGAA TAGATTCTTGTCTTAGAAGTTT TTAAAGCATTCTGTCACGTGCC ACTGAAACAATGG
<i>LAT2</i>	GTGTTGTCTCCTAGAAATCGCGA GCATGTAGTTTATTTT	GAAATAAACTACATGCTCGCGA TTCTAGGAGACAACAC
<i>S100B</i>	CAAAGCCTTATCCTCGCGAGTT TGAAAACACTGCTG	CAGCAGTGTTTTCAAACTCGCG AGGATAAGGCTTTG
<i>STARD8</i>	(Nicht benötigt, wegen Randbereichslage der zu mutierenden Bindestelle)	CGAGCTCTAAAGTCATCTCTG GCTCGCGATTATTGATTTGAGG G

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-*Primer* wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) oder der metabion GmbH (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) synthetisiert. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben (Synthese-Report) zu einer Konzentration von 100 pmol/ μ l in Nuklease-freiem Wasser gelöst und für den Einsatz in der Polymerase-Kettenreaktion zu Arbeitslösungen von 25 μ M (=25 pmol/ μ l) verdünnt.

3.1.5. Synthetische miRNA-Oligonukleotide

Zur Erstellung von Eichkurven im Rahmen der quantitativen miRNA-Analysen wurden synthetische miRNA-Oligonukleotide verwendet. Diese wurden auf Grundlage der reifen miRNA-Sequenzen (MiRNA-Datenbank; miRBase, release 22) designt (KOZOMARA et al., 2019) und sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten miRNA-Oligonukleotide.

Die dargestellten Oligonukleotide wurden auf Grundlage der reifen miRNA-Sequenzen (Humane (*Homo sapiens*) miRNAs; hsa-miRs) erstellt (KOZOMARA et al., 2019) und verwendet, um Eichkurven für die quantitative Analyse der miRNA-Expression mittels Microarray und Taqman-Analysen zu erstellen.

miRNA	Oligonukleotid-Sequenz (5'→3')
hsa-miR-15a-5p	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG
hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC
hsa-miR-132-3p	U AACAGUCUACAGCCAUGGUCG
hsa-miR-155-5p	UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGGUU
hsa-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU
hsa-miR-221-3p	AGCUACA UUGUCUGCUGGGUUUC
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA

Die Oligonukleotide wurden als einzelsträngige RNAs von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die qualitative Analyse fand mittels massenspektrometrischer Analyse (MALDI-TOF) durch die Herstellerfirma statt. Die resultierenden Spektren wurden mir mit Angabe des Molekulargewichtes des zugehörigen Oligonukleotides als zusammenfassende Bilddateien von der Herstellerfirma übermittelt. Die Oligonukleotide wurden in lyophilisierter Form geliefert und nach Herstellerangaben (Synthesereport) zu einer Konzentration von 100 pmol/μl in RNase-freiem Wasser gelöst. Anschließend wurden Verdünnungsreihen in RNase-freiem Wasser hergestellt, um die synthetischen miRNAs zu verschiedenen Mengen auf die Eichreaktionen der Microarray- und Taqman-Analysen zu verteilen.

3.1.6. Plasmidvektoren

3.1.6.1. pSG5, pSG5-miR-155 und pSG5-miR-21 Expressionsplasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der leere pSG5-Plasmidvektor und pSG5 basierte Expressionsplasmide der miR-155 und der miR-21 verwendet.

Bei dem pSG5-Plasmidvektor (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, Vereinigte Staaten, **Abbildung 4**) handelt es sich um ein Expressionsplasmid des *high-copy* Typus. Es kann somit verwendet werden, um eine hohe Expression des gewünschten Gen-*Inserts* in eukaryontischen Zellen zu erzeugen. Diese wird über einen SV40 Promotor (P SV40) und das zugehörige SV40-Polyadenylierungssignal (SV40 pA) gesteuert. *Insert*-Sequenzen können über Schnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRI*, *BamHI* und *BglII* in den Plasmidvektor ligiert werden. Ein bakterieller Replikationsursprung (pUC ori) und ein Ampicillin-Resistenzgen ermöglichen eine Amplifikation im bakteriellen System und die Selektion transformierter Bakterien in entsprechender Antibiotika-Umgebung.

The pSG5 Vector

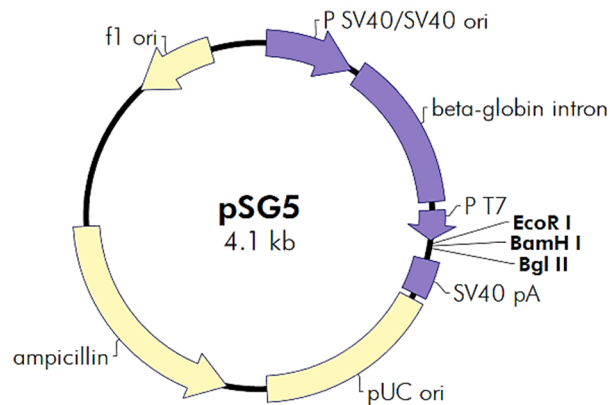


Abbildung 4: Vektorkarte des pSG5-Expressionsplasmids.

(Quelle: Hersteller-Abbildung der Firma Agilent Technologies)

Das pSG5-miR-155 und das pSG5-miR-21-Effektorplasmid wurden im Vorfeld der Arbeit am Institut für Virologie (Universitätsklinikum des Saarlandes, Standort Homburg) kloniert und wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. em. Dr. rer. nat. Friedrich Grässer zur Verfügung gestellt. Sie enthalten die Sequenz der jeweiligen pre-miRNA sowie Bereiche der umliegenden Sequenz, um eine korrekte miRNA-Prozessierung zu ermöglichen (miR-21-Sequenzbereich (GRCh38/hg38): Chr17:59841146-59841444; miR-155-Sequenzbereich (GRCh38/hg38): Chr(Chromosom)21:25573903-25574133). Die Überexpression der reifen miRNAs (hsa-miR-21-5p und hsa-miR-155-5p) wurde im Rahmen dieser Arbeit im Vergleich zu einer Negativkontrolle des leeren pSG5-Plasmides mittels miRNA-spezifischer Taqman RT-qPCR verifiziert (vergleiche Anhang, **Abbildung A 1**).

3.1.6.2. pMIR-RNL-TK-Reporterplasmide

Für die Testung im Rahmen der dualen Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurden 3'UTR-Sequenzen potenzieller miRNA-Zielgene in das Reporterplasmid pMIR-RNL-TK kloniert. Dieses wurde auf Grundlage des pMIR-REPORT Luciferase Vektors (Ambion, Austin, Texas, Vereinigte Staaten) generiert. Die Polylinkerregion des pMIR-REPORT-Vektors liegt im 3'-Sequenzbereich eines *Firefly Luciferase* Gens, welches durch die Kontrolle eines Promotorsystems des humanen Cytomegalievirus (CMV) konstitutiv in eukaryontischen Zellen exprimiert wird. Das resultierende mRNA-Transkript wird somit post-transkriptionell über die inserierte 3'UTR-Sequenz reguliert (BEITZINGER et al., 2007). Bei einer Überexpression der miRNA liefert die Menge der translatierten Firefly-Luciferase Informationen zur Bindung der miRNA an die zu testende 3'UTR und damit über die Regulation des entsprechenden Zielgenes. Das Proteinprodukt des Firefly-Luciferase-Reportergens wird dazu indirekt in einer Lichtreaktion nachgewiesen (DYER et al., 2000; GREER, SZALAY, 2002; STABLES et al., 1999). Bei pMIR-RNL-TK (**Abbildung 5**) wurde zusätzlich das Gen der Renilla-Luciferase unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven SV40-Promotors in das Plasmid eingefügt (BEITZINGER et al., 2007). Die Lichtreaktion der Renilla-Luciferase kann daher genutzt werden, um das Messergebnis der Firefly-Luciferase bezüglich der Transfektionseffizienz zu normieren (BEITZINGER et al., 2007; DYER et al., 2000; STABLES et al., 1999). Ein bakterieller Replikationsursprung (*ori*) und ein Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*) ermöglichen eine Amplifikation des pMIR-RNL-TK-Plasmids im bakteriellen System und die Selektion transformierter Bakterien in entsprechender Antibiotika-Umgebung. Das pMIR-RNL-TK-Plasmid wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. em. Dr. rer. nat. Friedrich Grässer zur Verfügung gestellt. 3'UTR-Sequenzen potenzieller miRNA-Zielgene wurden über Schnittstellen der Restriktionsenzyme *SpeI* und *SacI* oder *SacI* und *NgoMIV* in die Polylinkerregion des Reporterplasmids kloniert.

3. Material und Methoden

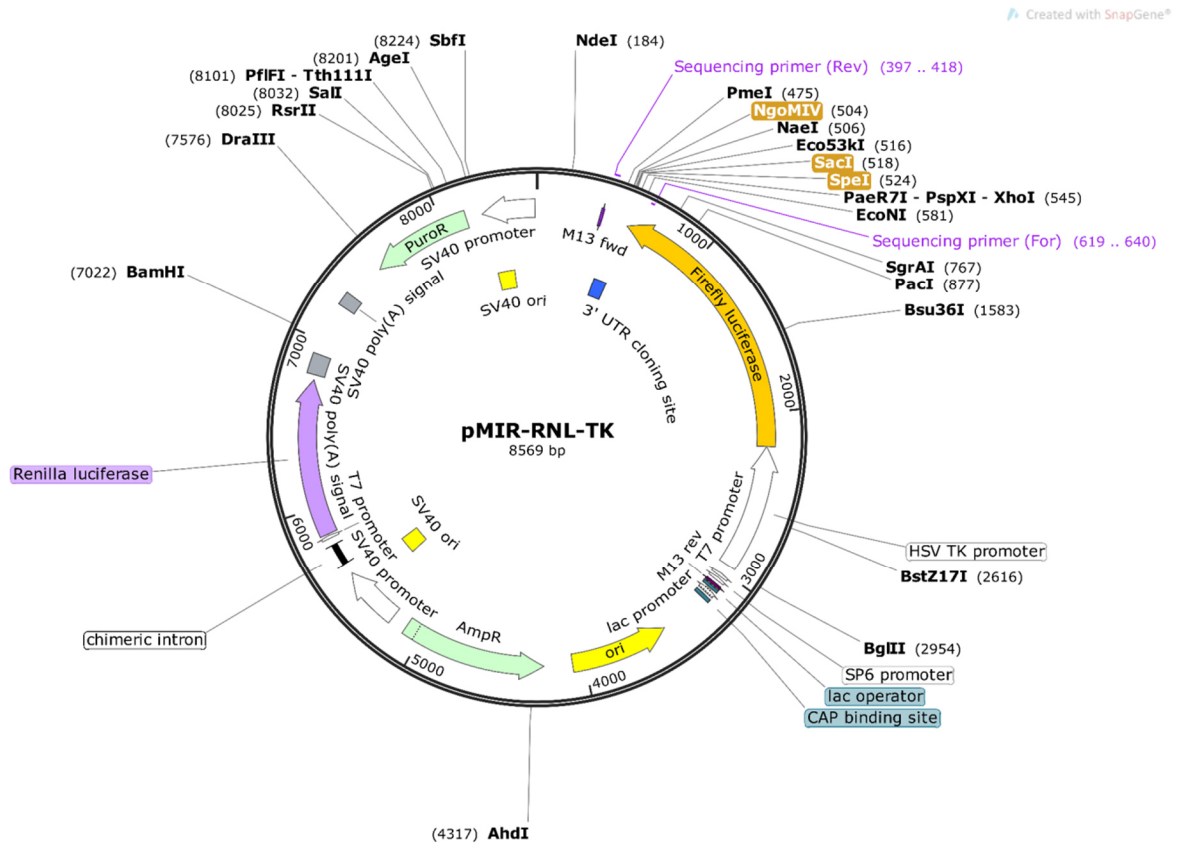


Abbildung 5: Vektorkarte des pMIR-RNL-TK-Reporterplasmids.

Für die Testung im dualen Luciferase-Reportergen-Assay wurden 3'UTR-Sequenzen potenzieller miRNA-Zielgene über Schnittstellen der Restriktionsenzyme *SpeI* und *SacI* oder *SacI* und *NgoMIV* in die Polylinkerregion des Reporterplasmids pMIR-RNL-TK kloniert. Diese liegt im 3'UTR-Bereich der Firefly-Luciferase, so dass das resultierende Luciferase-Transkript unter Kontrolle der klonierten Sequenz gestellt wird.

(Eigene Darstellung; die Abbildung wurde auf Grundlage der Vektorsequenz mit dem Programm SnapGene Viewer 5.2.1 (GSL Biotech LLC) erstellt)

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten und verwendeten pMIR-RNL-TK-3'UTR-Reporterkonstrukte sind in der folgenden **Tabelle 5** aufgelistet. Die Wildtyp und mutierten Reporterkonstrukte der *LAT2*-, *S100B*- und *TAF7*-3'UTRs wurden im Rahmen einer von mir betreuten Bachelor-Arbeit durch Frau Sarah Pawusch am Institut für Humangenetik kloniert (Universität des Saarlandes, Standort Homburg). Das pMIR-ZFP36- und das pMIR-FOS-Plasmid 3'UTR-Plasmid stammen aus anderen Projekte des Instituts für Humangenetik (HART et al., 2019; KERN et al., 2021) und wurden mir freundlicher Weise von Herrn Dr. rer. nat. Martin Hart (Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes, Standort Homburg) zur Verfügung gestellt.

3. Material und Methoden

Tabelle 5: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten pMIR-RNL-TK-3'UTR-Reporterkonstrukte.

Wegen der Größe der Sequenz und dem Vorhandensein mehrerer vorhergesagter miRNA-Bindestellen wurden zwei Teil-Konstrukte der *KDM5B* 3'UTR erstellt.

pMIR-RNL-TK-3'UTR-Reporter-konstrukt	Größe der klonierten 3'UTR-Sequenz (Inklusive Restriktionsschnittstellen) [nt]	Lokalisierung der klonierten 3'UTR-Sequenz (Humanes Genom (GRCh38.p12))
pMIR- <i>ADD3</i>	909	Chr. 10: 110,133,828-110,134,737
pMIR- <i>CYP2U1</i>	1005	Chr. 4: 107,952,202-107,953,207
pMIR- <i>DDX17</i>	1033	Chr. 22: 38,483,505-38,484,538
pMIR- <i>EZH1</i>	1017	Chr. 17: 42,700,879-42,701,896
pMIR- <i>FOS</i>	419	Chr.14: 75,281,425-75,281,901
pMIR- <i>HERC3</i>	998	Chr. 4: 88,707,228-88,708,226
pMIR- <i>IFT80</i>	1105	Chr. 3: 160,257,309-160,258,414
pMIR- <i>IL1RAP</i>	1169	Chr. 3: 190,649,694-190,650,862
pMIR- <i>JMY</i>	875	Chr. 5: 79,321,621-79,322,496
pMIR- <i>KDM5B_1</i>	673	Chr. 1: 202,728,344-202,729,017
pMIR- <i>KDM5B_2</i>	1008	Chr. 1: 202,725,705-202,726,713
pMIR- <i>LAT2</i>	805	Chr. 7:74,228,978-74,229,783
pMIR- <i>LEMD3</i>	844	Chr. 12: 65,246,665-65,247,508
pMIR- <i>LDLRAP1</i>	1085	Chr. 1: 25,567,547-25,568,632
pMIR- <i>RASA3</i>	615	Chr. 13: 113,978,619-113,979,234
pMIR- <i>RXRA</i>	700	Chr. 9: 134,439,864-134,440,564
pMIR- <i>S100B</i>	629	Chr. 21: 46,598,714-46,599,343
pMIR- <i>SH3BP4</i>	1056	Chr. 2: 235,054,371-235,055,427
pMIR- <i>SORL1</i>	947	Chr. 11: 121,632,477-121,633,424
pMIR- <i>STARD8</i>	1191	Chr. X: 68,724,657-68,725,848
pMIR- <i>TADA2B</i>	976	Chr. 4: 7,056,120-7,057,096
pMIR- <i>TAF7</i>	504	Chr. 5: 141,318,494-141,318,998
pMIR- <i>ZFP36</i>	749	Chr. 19: 39,408,670-39,409,419

3.1.7. Laborgeräte

Geräteart	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Zentrifugen	SIGMA 2-16K mit Kühlung	Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz, Deutschland
	Centrifuge 5425	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
	UNIVERSAL 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen, Deutschland
	Centrifuge 5810R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Zellkultur	Heraeus Laminair HB 2448 K Sterilbank/Sicherheitswerkbank	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
	New Brunswick Incubator CO ₂ Galaxy 170S (Eukaryontische Zellkultur)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
	Brutschrank Jouan EB53 (Bakterien-Kultur)	Jouan GmbH	Unterhaching, Deutschland
	Schüttelinkubator HT Unitron (Bakterien-Kultur)	Infors AG	Bottmingen, Schweiz
Laborschüttler	Mischblock/Heizblock Bioer MB-102 Thermocell	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd	Zhejiang, Hangzhou, China
	Laborschüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
	Reagenzglasschüttler Vortex-Genie 2T	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop	Nikon Eclipse TS100	Nikon Europe BV	Amsterdam, Niederlande

3. Material und Methoden

Geräteart	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Magnetrührer	PHOENIX Instrument RSM-01	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Wasser- und Eisanlage	Reinstwasseranlage ELGA PURELAB Chorus, PURELAB flex Dispenser	ELGA LabWater/Veolia Water Technologies Deutschland GmbH	Celle, Deutschland
	Flockeneisbereiter Flake-Line	WESSAMAT Eismaschinenfabrik GmbH	Kaiserslautern, Deutschland
Wasserbäder	Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, Deutschland
	B. Braun Biotech Thermomix BU	B. Braun Mesungen AG	Melsungen, Deutschland
Netzgeräte	EV231 Electrophoresis Powersupply	NeoLab Migge GmbH	Heidelberg, Deutschland
	Standard Power Pack P25T	Biometra GmbH	Göttingen, Deutschland
Elektrophorese -Kammer	Geltray UV- transparent	Renner GmbH	Dannstadt, Deutschland

3.1.8. Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Bemis Curwood Parafilm M Labor-Verpackungsfolie	Bemis	Neenah, Wisconsin, Vereinigte Staaten
epMotion Reservoir (10 ml; 30 ml)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research plus Pipetten (0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 2-20 µl; 20-200 µl; 100-1.000 µl)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Assay/Reader-Platten (96-well, weiß)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Hybridization Gasket Slide Kit - 8 microarrays per slide format	Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Kryogefäße Cryo.S (2 ml)	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Messröhrchen (Röhren, Rundboden, transparent, Polystyrol, 5 ml)	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate (mit Barcode, 0,1 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Mikrotiterplatten (6-well; 24-well)	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Mikrotiterplatten (96-well; RNase/Dnase frei)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipetten (Steril; 5 ml; 10 ml; 25 ml)	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen eTIPS Motion (50 µl; 300 µl; 1.000 µl)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Multiguard Barrier Tips (10 µl; 20 µl; 200 µl; 1.000 µl)	Sorenson Bioscience, Inc.	Salt Lake City, Utah, Vereinigte Staaten
Pipettierhilfe Accu-jet pro	Brand Scientific GmbH	Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße (flacher Deckel; 0,2 ml)	VWR International, LLC	Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten

3. Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Reaktionsgefäße (Safe-lock; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
RNase-freie Reaktionsgefäße (1,5 ml; aus dem miRNeasy Micro Kit)	Qiagen N.V.	Hilden, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ²)	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich

3.1.9. Software, *in-silico* Tools und Websites

Die zugehörigen Entwickler und Websites der *Software* und *Tools* sind nachfolgend in **Tabelle 6** aufgelistet.

Zur Textverarbeitung wurde im Rahmen dieser Arbeit „Microsoft Office Word“ verwendet. Zur Verwaltung der Literatur-Referenzen wurde das Programm „EndNote X8“ genutzt.

Die Abbildungen wurden unter Verwendung von „GraphPad Prism 7“, „PDF24 Creator“, „CorelDRAW 12.0“, „SnapGene Viewer 5.2.1“, „Microsoft Office Powerpoint“ sowie dem „PPT-Illustration Toolkit“ erstellt und bearbeitet.

Für die Kontrolle von Sequenzierungsergebnissen wurde das Programm „FinchTV“ Version 1.5.0 genutzt. Für den Abgleich von DNA-Sequenzen wurde das „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) verwendet.

Informationen zu mRNA-Sequenzen und 3'UTRs entstammen den Informationen des NCBI (NCBI Reference Sequences (RefSeq)). Für das Design von Oligonukleotid-*Primern* wurden die zugehörigen Schmelztemperaturen mit Hilfe des „Oligonucleotide Properties Calculators“ ermittelt und die *Primer*-Spezifität mittels *in-silico* PCR (BiSearch: Primer Design and Search Tool) überprüft. Zu amplifizierende 3' UTR-Sequenzen wurden mit Hilfe des „Webcutter 2.0“ *Tools* auf das Vorhandensein von Schnittstellen der (im Rahmen der Klonierung verwendeten) Restriktionsenzyme überprüft.

Informationen zu humanen miRNA-Sequenzen (Humane (*Homo sapiens*) miRNAs, hsa-miRs) entstammen den Informationen der miRNA-Datenbank (miRBase) (KOZOMARA et al., 2019).

3. Material und Methoden

Listensortierungen und einfachere Rechenoperationen wurden mithilfe von „Microsoft Office Excel“ vorgenommen. Statistische Auswertungen wurden mithilfe der „GraphPad Prism 7“ *Software* oder bei Unterstützung durch das Zentrum für Bioinformatik mit der Programmiersprache „R“ sowie integrierbarer *R packages* bzw. der Programmiersprache „C++“ durchgeführt (Vergleiche Methodenteil). Die bioinformatisch prozessierten Datensätze der Microarray-Hoch-Durchsatz-Analysen wurden auf der „Gene Expression Omnibus“-Plattform des NCBI, der Quelltext (*Source Code*) und die Auswertungen der miRNA-*Cluster*-Analysen bei dem Verwalterdienst „GitHub“ hinterlegt (vergleiche auch Methodenteil).

Die Nutzung weiterer *Websites* und *Tools* ist im Methodenteil an entsprechender Stelle beschrieben.

Tabelle 6: Entwickler und Websites der verwendeten Software und Tools.

Software/Tool	Entwickler bzw. zugehörige Website
Agilent Scan Control (Microarray)	Agilent Technologies
Agilent Feature Extraction Software	Agilent Technologies
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Bioanalyzer 2100 Expert Software	Agilent Technologies
C++ (Programmiersprache)	Bjarne Stroustrup, isocpp.org
CorelDRAW 12.0	Corel Corporation
DeVision G Vers. 2.0	Decon Science Tec GmbH
EndNote X8	Clarivate Analytics
FinchTV Version 1.5.0	PerkinElmer
GeneTrail 2.0/3.0	genetrail.bioinf.uni-sb.de
Gene Expression Omnibus(GEO)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
GitHub, Inc./Microsoft Corporation (Quelloffener Software-Verwalter Dienst)	https://github.com/unisb-bioinf
GraphPad Prism 7	Graphpad Software, Inc.
Microsoft Office Excel, Powerpoint & Word 2007/2016	Microsoft Office Home and Student; Microsoft Corporation
miRBase release 21 und 22	http://www.mirbase.org/

3. Material und Methoden

Software/Tool	Entwickler bzw. zugehörige Website
MicroRNA.org (MiRanda-Algorithmus)	http://www.microrna.org
miRTargetLink Human	https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/
miRWalk 2.0	http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/
Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
PDF24 Creator	geek Software GmbH
PPT-Illustration Toolkit	Motifolio Inc.
Primer Design and Search Tool	http://bisearch.enzim.hu/
R (Programmiersprache)	R Core Team; www.R-project.org
SnapGene Viewer 5.2.1	GSL Biotech LLC
TargetScan Release 7.2	http://www.targetscan.org/vert_72/
Webcutter 2.0	http://heimanlab.com/cut2.html

3.2. Experimente mit humanen T-Zellen

3.2.1. Entnahme von Spenderblut und Erstellung des Hämatogrammes

Für die Hoch-Durchsatz-Analyse von zeitaufgelösten RNA-Expressionsprofilen wurden Blutproben von zwei weiblichen Spendern vergleichbaren Alters entnommen (Alter der Spender 1 und 2: 26 und 23 Jahre). Venöse Blutproben wurden in „S-Monovette®“-Blutentnahmeröhrchen der Firma Sarstedt AG&Co. KG (Nümbrecht, Deutschland) gesammelt, welche zur Antikoagulation Lithium-Heparin enthielten.

Das aktuelle Blutbild der Probanden 1 und 2 wurde zum Entnahmezeitpunkt bestimmt. Dazu wurden zusätzliche Aliquots venösen Blutes in Blutentnahmeröhrchen, die den Gerinnungshemmer Ethylendiamintetraacetat (EDTA) enthielten, gesammelt und das Hämatogramm automatisiert untersucht (Sysmex XN1000, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland).

Für die spätere Validierung der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsmuster (Taqman-Assays) wurde die Spendergruppe um vier zusätzliche Probanden, gleichen Geschlechts und vergleichbaren Alters, erweitert (Alter der Spender 1-6: 27, 24, 25 und 28 Jahre).

Die Entnahme der Blutproben wurde freundlicher Weise von Frau Laura Nickl (Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes, Standort Homburg) vorgenommen.

Die Analysen des Blutbildes wurden von Herrn Dr. rer. nat. David Schub (Arbeitsgruppe Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester; Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie, Universität des Saarlandes, Standort Homburg) koordiniert und durch das Zentrallabor der Universitätsklinik des Saarlandes (Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin; Leitung: Prof. Dr. med. Jürgen Geisel) durchgeführt. Die Analysedaten wurden mir freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Die Untersuchung von RNA-Expressionsprofilen auf Grundlage von Blutzellproben im Rahmen dieser Arbeit wurden durch die Ethikkommission der Universität des Saarlandes bewilligt (Antrags IDs: 213/08 und 121/18). Die Einwilligung der Probanden wurde nach erfolgter Aufklärung in schriftlicher Form festgehalten.

3.2.2. Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Im Anschluss an die Entnahme der Blutproben wurden die mononukleären Blut-Zellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert. Durch das Verfahren der Dichtegradientenzentrifugation können die Blutbestandteile anhand ihrer Verteilung entlang eines Dichtegradienten aufgetrennt werden (NOBLE, CUTTS, 1967). Dazu wird ein Dichtegradientenmedium mit hoher molekularer Dichte, welches in der Regel aus Saccharose-Polymeren besteht, vorgelegt und mit der Blutprobe überschichtet (DAINIYAK et al., 2007; KLEIVELAND, 2015; NOBLE, CUTTS, 1967). Mittels Zentrifugation werden im Folgenden die zellulären und nicht-zellulären Bestandteile des Blutes auf Basis unterschiedlicher Sedimentationsgeschwindigkeiten in verschiedene Zonen aufgetrennt, wobei die Dichte in Richtung des Gefäßbodens zunimmt (DAINIYAK et al., 2007). Dabei bildet das Blutplasma die oberste Sedimentationsschicht. Darunter bilden die PBMCs und Thrombozyten eine zelluläre Zwischenschicht, gefolgt vom Dichtegradientenmedium. Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren unterhalb des Dichtegradientenmediums (BROSSERON et al., 2012; KLEIVELAND, 2015; ROSADO et al., 2019). Nach dem Überführen der zellulären Zwischenschicht werden die Thrombozyten durch das Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Phosphate-buffered saline) entfernt, so dass die gereinigten PBMCs als Zellpellet verbleiben (KLEIVELAND, 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde das „Lymphocyte Separating Medium, Pancoll human“ (Dichte (ρ): 1,077 g/ml) nach dem Herstellerprotokoll der Firma PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland) verwendet. Nach dem finalen Waschschrift wurde das PBMC-Pellet in 10 ml PBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) resuspendiert. Die Gesamtzahl der lebensfähigen Zellen wurde anschließend anhand eines Probenaliquots und nach Färbung der toten Zellen mithilfe des Farbstoffs Trypanblau (Zellsuspension und 0,4%-ige Trypan-Blau-Lösung im Verhältnis eins zu eins gemischt; drei minütige Inkubation) in lichtmikroskopischer Zählung bestimmt (STROBER, 2001)). Da die PBMCs neben den Lymphozyten auch dendritische Zellen und Monozyten beinhalten (BROSSERON et al., 2012; KLEIVELAND, 2015; ROSADO et al., 2019), wurden die CD4+ T-Zellen im Weiteren von den nicht benötigten Zellen der PBMC-Fraktion getrennt.

Die Arbeiten zur Isolation der PBMCs wurden in Kooperation mit der Nachwuchsgruppe Virologie/Immunologie (Universität des Saarlandes, Standort Homburg; Zentrum für Human- und Molekularbiologie) unter Anleitung sowie mit experimenteller Unterstützung von Frau Tanja Tänzer und Frau PD Dr. rer. nat. Barbara Walch-Rückheim durchgeführt. Im Anschluss wurden die CD4+ T-Zellen im gleichen Labor angereichert.

3.2.3. Negative Immunselektion von CD4+ T-Zellen

Die CD4+ T-Zellen wurde mittels negativer Immunselektion aus dem Zellgemisch der PBMCs isoliert.

Bei diesem Verfahren werden die nicht benötigten Zellen mithilfe zelltypspezifischer Antikörper und kovalent gekoppelten magnetischen Kügelchen (*Beads*) markiert, um diese bei der folgenden Magnettrennung innerhalb eines Magnetfeldes zurückgehalten. Die Zielzellen werden hingegen nicht immuno-magnetisch markiert und können somit unbeeinflusst von Antikörper-Interaktionen und von der Magnetwirkung als Durchfluss gesammelt werden (DAINIYAK et al., 2007). Bei der negativen Selektion kann eine vorzeitige Aktivierung der Zielzellen, welche beispielsweise durch die Antikörper gekoppelte Induktion von zellulären Signalwegen ausgelöst werden kann, vermieden werden (DAINIYAK et al., 2007).

Zur Anreicherung der CD4⁺ T-Zellen wurde das „Human CD4⁺ T cell Isolation Kit“ der Firma Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die isolierten CD4⁺ T-Zellen wurden nach Trypanblau-Färbung gezählt (wie zuvor beschrieben), pelletiert und zu einer Konzentration von $3,5 \times 10^5$ Zellen/100 μ l in „Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640“ Medium (Gibco RPMI 1640, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) resuspendiert, das mit 10 % v/v hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FBS (Fetal bovine serum) superior, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) und 1 % v/v Penicillin-Streptomycin (Gibco Penicillin-Streptomycin 100 U/ml; Thermo Fisher Scientific) versetzt war.

Die Arbeiten zur Isolation der CD4⁺ T-Zellen wurden in Kooperation mit der Nachwuchsgruppe Virologie/Immunologie (Zentrum für Human- und Molekularbiologie; Universität des Saarlandes, Standort Homburg) unter Anleitung sowie mit experimenteller Unterstützung von Frau Tanja Tänzer und Frau PD Dr. rer. nat. Barbara Walch-Rückheim durchgeführt. Nach der Anreicherung wurden mir die CD4⁺ T-Zellen zur weiteren Bearbeitung freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Zellen, deren RNA erst zu einem späteren Zeitpunkt isoliert werden sollte, wurden direkt im Anschluss an die Isolation in vitalem Zustand kryokonserviert und innerhalb von 13 Monaten weiterverwendet (Kryomedium aus: 60 % RPMI 1640 Medium, 30 % FBS, 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid); Lagerung der Kryogefäße in flüssigem Stickstoff).

3.2.4. Bestimmung des Reinheitsgrades von isolierten CD4⁺ T-Zellen

Der Reinheitsgrad der isolierten Zellen, welche für die Hoch-Durchsatz-Analysen von zeitaufgelösten RNA-Expressionsprofilen verwendet werden sollten (Spender 1 und 2), wurde durch den Nachweis der Expression des CD4-Oberflächenrezeptor überprüft.

Dazu wurde ein Aliquot von 100.000 Zellen mithilfe eines Allophycocyanin (APC) gekoppelten, CD4-spezifischen Antikörpers (α CD4-APC, Cat#561840, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gefärbt. Der Anteil der fluoreszierenden Zellen wurde mittels Laserdetektion im Durchflusszytometer (FACS Canto II; Becton, Dickinson (BD) and Company; Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten) bestimmt.

Die zelluläre Färbung und die durchflusszytometrische Analyse der Fluoreszenz wurden in Kooperation mit der Nachwuchsgruppe Virologie/Immunologie (Zentrum für Human- und Molekularbiologie; Universität des Saarlandes, Standort Homburg) von Frau PD Dr. rer. nat. Barbara Walch-Rückheim durchgeführt. Die ausgewerteten Ergebnisse wurden mir freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

3.2.5. *In vitro* Aktivierung von T-Zellen und Sammeln von Zeitverlaufsproben

Zum Sammeln der Zeitverlaufsproben wurden die T-Zellen *in vitro* aktiviert. $3,5 \times 10^5$ der frisch isolierten CD4⁺ T-Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl/Kavität in eine Mikrotiterplatte (mit insgesamt 96-Kavitäten/96 wells) ausgesät. Zur Induktion der T-Zell-Aktivierung wurden Antikörper gekoppelte *Beads* zur Stimulation der CD3-, CD28 und CD2-Oberflächenrezeptoren zugegeben (α CD2/ α CD3/ α CD28 MACSiBead™ particles“ (T cell activation/expansion kit, human; nach Herstellerangaben der Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland). Nach Zugabe der *Beads* wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und bei fünfprozentigem CO₂-Gehalt inkubiert.

Die Entnahme der Zeitverlaufsproben für die folgenden Microarray-Analysen fand in Intervallen von 2 h und über einen Zeitraum von 0-24 h statt. Für jeden Analysezeitpunkt wurden drei Proben (gesamte Zellsuspension) aus separaten Kavitäten der Mikrotiterplatte entnommen. Insgesamt wurden somit pro Spender 39 Zell-Proben gesammelt.

Die Entnahme der Zeitverlaufsproben für die Validierungsexperimente fand zu den Zeitpunkten von 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h statt. Zusätzlich wurde für jeden der Spender 3-6 eine inaktive Zellprobe (ohne Hinzufügen der α CD2/ α CD3/ α CD28-gekoppelten *Beads*) über 24 h mitgeführt. Insgesamt wurden somit pro Spender 7 Zell-Proben gesammelt.

Zur Entnahme wurden die Zellen in RNase-freie Reaktionsgefäße überführt, für 10 Minuten bei 1600 rpm pelletiert und sofort mithilfe von je 700 µl „QIAzol® Lysis Reagent“ (aus dem miRNeasy Micro Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland; vergleiche Kapitel 3.6.1. Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion von zellulärer RNA) lysiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen bis zur Isolation der RNA bei -70 °C gelagert.

Die *Beads* wurden in Kooperation mit der Nachwuchsgruppe Virologie/Immunologie (Arbeitsgruppe PD Dr. rer. nat. Barbara Walch-Rückheim, Zentrum für Human- und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes, Standort Homburg) von Frau Tanja Tänzer nach Herstelleranleitung mit den Antikörpern beladen. Die gebrauchsfertigen *Beads* wurden mir freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Die Entnahme der Zeitverlaufsproben wurde in gemeinsamer Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. Martin Hart (Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes, Homburg) durchgeführt.

3.3. Experimente mit humanen Zelllinien

3.3.1. Kultivierung humaner Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die dualen Luciferase-Assays adhärente Zellen der humanen, embryonalen 293T Nieren-Zelllinie (Human Embryonic Kidney 293T, HEK293T) verwendet. Durch die Expression eines Simian-Virus 40 (SV40) T-Antigens kann diese viral immortalisierte Zelllinie Vektoren mit einem SV40-Replikationsursprung, wie das pMIR-RNL-TK-Plasmid, eigenständig replizieren (GRAHAM et al., 1977; RIO et al., 1985; STEPANENKO, DMITRENKO, 2015).

Zudem wurde die humane T-Lymphozyten-Zelllinie, Jurkat, verwendet, um RNA-Proben für die Erstellung einer cDNA-Bank mit T-zellulärem Hintergrund zu gewinnen. Diese Suspensions-Zelllinie wurde ursprünglich aus Blutproben eines an akuter lymphatischer Leukämie erkrankten Spenders isoliert (SCHNEIDER et al., 1977).

Die HEK293T- (ACC635) und die Jurkat-Zelllinien (ACC282) wurden mit Verifikation des genetischen Hintergrundes (Spezies-PCRs und Analyse charakteristischer repetitiver DNA-Sequenzen (Mikro- und Minisatelliten)) von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ; Leibniz-Institut; Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Die humanen Zelllinien wurden in 20 ml Kulturmedium, in 25 cm² oder 75 cm²-Kulturflaschen, bei 37 °C und unter 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die HEK293T-Zellen wurden dabei in „Dulbecco's modified Eagle's Medium“ (Gibco DMEM, high glucose, pyruvate) und die Jurkat-Zellen in RPMI 1640 Medium (Gibco RPMI 1640) gehalten. Diese Zellkulturmedien wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) bezogen und mit 10 % v/v FBS (FBS superior; Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) sowie 1 % v/v Penicillin-Streptomycin (Gibco Penicillin-Streptomycin 100 U/ml; Thermo Fisher Scientific) versetzt. Zur Passage und zum Aussäen der adhärenen HEK293T-Zellen wurden diese, nach dem Abnehmen des Mediums, mit 1 ml Trypsin-EDTA (Gibco, 0,05 %; Thermo Fisher Scientific) gewaschen, um Zelldebris und Reste des Mediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen enzymatisch mithilfe von 1 ml Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst und in frischem Medium resuspendiert.

3.3.2. Chemische Transfektion

Zur Transfektion der HEK293T-Zellen mit Reporterplasmiden und miRNA-Expressionsplasmiden wurde das „PolyFect™“ Transfektionsreagenz der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Dabei handelt es sich um ein Reagenz aus kationischen Polyamidoamin Dendrimeren (AKHTAR et al., 2015). Über elektrostatische Wechselwirkungen bildet dieses einen Komplex mit der negativ geladenen Plasmid-DNA, die dann über Endozytose in die Zelle aufgenommen und intrazellulär freigesetzt wird (KESHARWANI et al., 2015).

Für die Transfektion im Rahmen der Hoch-Durchsatz-Luciferase-Assays wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion automatisch mithilfe eines „Liquid-Handling-System epMotion 5075“ Gerätes der Firma Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) in einer 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät ($2,4-2,6 \times 10^4$ Zellen/Kavität). Am folgenden Tag wurden die Zellen dann automatisch und unter Verwendung des Transfektionsreagenzes mit 50 ng des leeren pMIR-RNL-TK-Reporterplasmids oder des entsprechenden pMIR-3'UTR-Reporterkonstruktes in Kombination mit 200 ng des leeren pSG5- oder des pSG5-miR-155-Expressionsplasmids transfiziert. Die Transfektionsmethodik entsprach dabei der experimentellen Vorgehensweise des „high-throughput miRNA interaction reporter (HiTmiR)“ Assays (KERN et al., 2021).

Für die Testung von kombinatorischen Effekten der miR-155-5p und der miR-21-5p wurden die Zellen manuell in eine 24-well-Mikrotiterplatte ausgesät ($5-7 \times 10^4$ Zellen/Kavität). 0,2 µg des jeweiligen Reporterplasmids (pMIR-RNL-TK/pMIR-3'UTR-Reporterkonstrukt) wurden mit i) 0,8 µg des leeren pSG5-Expressionsplasmids oder 0,8 µg eines Gemisches aus ii) pSG5 und pSG5-miR-155, iii) pSG5 und pSG5-miR-21 oder iv) pSG5-miR-21 und pSG5-miR-155 (Verhältnis: 1:1 w/w) vermischt. Anschließend wurden die Ansätze nach Herstellerangaben mit jeweils 50 µl Antibiotika- und FBS-freiem Zellkulturmedium verdünnt und mit 2 µl Transfektionsreagenz versetzt. Die Ansätze wurden gemischt, zur Bildung der Transfektions-Komplexe für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich auf die Zellen getropft. Durch vorsichtiges Schwenken wurden die Transfektions-Komplexe mit dem Zellkulturmedium vermischt.

Zur Kontrolle der Expression des pSG5-miR-155 beziehungsweise pSG5-miR-21-Plasmides wurden die HEK293T-Zellen am Tag vor der Transfektion bei einem Gesamtvolumen von 3 ml in einer 6-well-Mikrotiterplatte ausgesät ($6,00 \times 10^5$ Zellen/Kavität). Am Folgetag wurden die Zellen unter Verwendung des PolyFect-Transfektionsreagenzes mit 2 µg der Plasmid-DNA transfiziert.

Zur Expression der Plasmide wurden die Zellen für 48 h im Brutschrank (37 °C und 5 % CO₂) inkubiert.

3.3.3. Bestimmung der Zellanzahl bei den Experimenten mit humanen Zelllinien

Bei den Experimenten mit humanen Zelllinien wurde die Zellanzahl auf Basis eines Aliquots der zellulären Probe bestimmt. Es wurde ein automatisiertes Zellzählgerät (LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter; mit LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter Counting Slides; Logos Biosystems Inc., Südkorea) verwendet. Die Lichtfeld-Zählung wurde ohne Trypanblau-Färbung durchgeführt. Die Zellzahl/ml wurde als Mittelwert aus zwei aufeinander folgenden Zählungen ermittelt.

3.3.4. Duale Luciferase-Reporter-Gen-Assays

Zur experimentellen Testung vorhergesagter miRNA-Zielgen-Beziehungen, wurden duale Luciferase-Reporter-Gen-Assays (*dual luciferase reporter gene assays*) durchgeführt.

Dazu wurde die 3'UTR-Sequenz des jeweils zu testenden Genes in die Polylinker-Region des pMIR-RNL-TK-Plasmides kloniert. Diese liegt im 3'-Sequenzbereich eines Reportergens der Firefly-Luciferase. Das zugehörige Transkript kann somit unter den regulatorischen Einfluss der klonierten 3'UTR-Sequenz gebracht werden (BEITZINGER et al., 2007). Da es sich bei der Firefly-Luciferase um ein lumineszierendes Protein der nordamerikanischen Leuchtkäferart *Photinus pyralis* handelt (DE WET et al., 1985), kann die Expression des Reportergens indirekt in einer messbaren Lichtreaktion nachgewiesen werden (DYER et al., 2000; GREER, SZALAY, 2002; STABLES et al., 1999). Zusätzlich enthält das duale pMIR-RNL-TK-Plasmide ein konstitutiv exprimiertes Luciferase-Gen der Federkoralle *Renilla reniformis* (BEITZINGER et al., 2007; GREER, SZALAY, 2002; LORENZ et al., 1991). Im Rahmen von alternierenden Luciferase-Aktivitäts-Messungen kann dieses für eine Normierung auf Basis der Transfektionseffizienz genutzt werden. Dazu wird mithilfe von spezifischen Substrat-Pufferlösungen zunächst die Firefly-Lumineszenz aktiviert und anschließend für die Bestimmung der Renilla-Luciferase-Aktivität wieder abgestoppt (DYER et al., 2000; STABLES et al., 1999). Unter gleichzeitiger Überexpression der zu untersuchenden miRNA und über den Vergleich zu analogen Kontrollmessungen des leeren Reporterplasmids liefern die normierten Messergebnisse Informationen zur Interaktion zwischen der miRNA und der klonierten 3'UTR-Sequenz. Eine 3'UTR gekoppelte Reduktion der Firefly-Aktivität gilt dabei als zuverlässiger Hinweis auf eine miRNA-Zielgen-Beziehung (BEITZINGER et al., 2007; CHOU et al., 2018; KUHN et al., 2008) (Überblick in **Abbildung 6**).

3. Material und Methoden

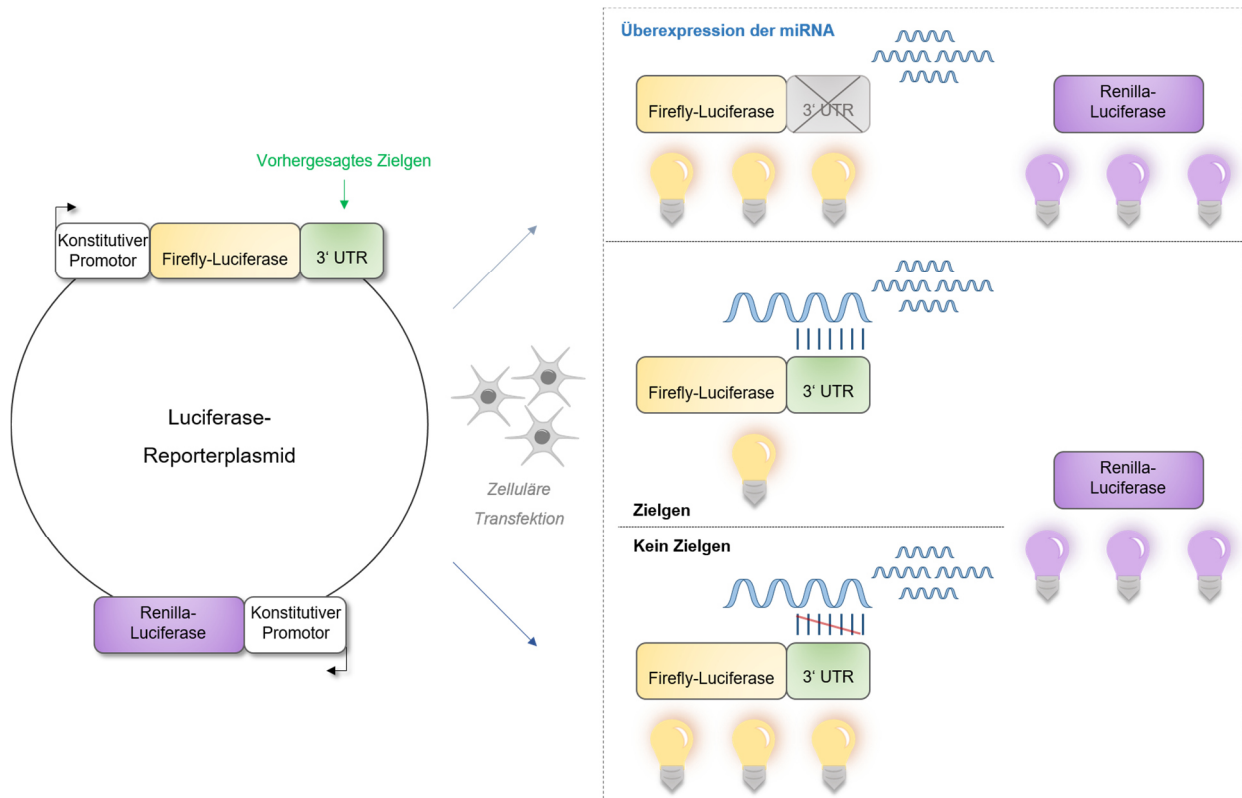


Abbildung 6: Schematischer Überblick zur Funktionsweise des dualen Luciferase-Assays.

Die zu testende 3'UTR-Sequenz wird innerhalb des Reporterplasmides in den 3'-Bereich des *Firefly-Luciferase*-Gens kloniert, um das resultierende Transkript unter den regulatorischen Einfluss der inserierten Sequenz zu stellen. Ein weiteres konstitutiv aktives Reporterogen (*Renilla-Luciferase*) innerhalb des Reporterplasmids, ermöglicht die spätere Normierung der Messergebnisse bezüglich der Transfektionseffizienz. Nach Transfektion und Inkubation von humanen Zellen mit dem Reporterplasmid und bei gleichzeitiger Überexpression der miRNA, werden die Firefly- und Renilla-Luciferase-Genprodukte innerhalb der Zellysate über eine entsprechende Lichtreaktion nachgewiesen. Beim Vergleich der Renilla-normierten Firefly-Luciferase-Aktivität zwischen Experimenten mit und ohne Insertion der 3'UTR, liefert eine Reduktion der relativen Firefly-Aktivität einen zuverlässigen Hinweis auf eine regulatorische Beziehung zwischen der miRNA und dem zu untersuchenden Zielgen. (*Eigene Darstellung*)

Zur Zellyse und für die folgende Durchführung der Luciferase-Aktivitätsmessungen wurden der „Passive Lysis Buffer“ (PLB) und das „Dual-Luciferase Reporter® Assay Systems Kit“ der Firma Promega (Madison, Vereinigte Staaten) nach Herstellerangaben verwendet.

Im Rahmen der Hoch-Durchsatz-Luciferase-Assays wurde die Zelllyse automatisiert mithilfe des „Liquid-Handling-System epMotion 5075“ Gerätes (Eppendorf AG) vorgenommen. Die Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität wurden in aufeinanderfolgenden Messungen mit einem „GlowMax navigator microplate luminometer“ der Firma Promega bestimmt. Die Hoch-Durchsatz-Messungen entsprachen der experimentellen Vorgehensweise des HiTmIR Assays (KERN et al., 2021). Als Positivkontrolle wurde ein pMIR-RNL-TK-3'UTR-Reporterkonstrukt des bereits bekannten miR-155-Zielgenes *FOS* (DUNAND-SAUTHIER et al., 2011) bei jeder Messung mitgeführt (siehe Anhang, **Abbildung A 2**).

Die Hoch-Durchsatz-Luciferase-Assays wurden unter Anleitung und in gemeinsamer Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. Martin Hart sowie Frau Stefanie Rheinheimer (Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes, Standort Homburg) durchgeführt.

Für die Testung von kombinatorischen Effekten der miR-155-5p und der miR-21-5p wurden die Zellen durch manuelles pipettieren lysiert. Die zu vermessenden Zellextrakte wurden vor der Vermessung in 1x PLB verdünnt (1:100 (v/v)). Die Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität wurden in aufeinanderfolgenden Messungen mit einem „Lumat LB 9507 Luminometer“ der Firma Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, Deutschland) bestimmt.

Zur Auswertung der Messdaten unter dem Einfluss der miRNA-Überexpression, wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase anhand der Renilla-Luciferase-Aktivität sowie der basalen Aktivität des jeweiligen Reporterplasmides (Co-Expression des leeren pSG5-Effektorplasmides) normiert. Die Ergebnisse der 3'UTR-Konstrukte wurden im Vergleich zur zugehörigen Kontrollmessung des leeren pMIR-RNL-TK-Reporters ausgewertet. Dazu wurde eine statistische Analyse mittels ungepaartem t-Test (mit ungleicher Varianz) und unter der Annahme einer Normalverteilung der Daten vorgenommen (GraphPad Prism 7, Graphpad Software, Inc.). Bei multiplen Vergleichen innerhalb der Hoch-Durchsatz-Analysen wurden die resultierenden p-Werte anhand des Verfahrens zur Reduktion der Falscherkennungsrate (*False Discovery Rate*; FDR) nach Benjamini und Hochberg angepasst (BENJAMINI, HOCHBERG, 1995). Ein (angepasster) p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

3.4. Hitzeschock-Transformation und Amplifikation von Plasmiden im bakteriellen System

Um die klonierten Plasmide im bakteriellen System zu amplifizieren, wurde die Plasmid-DNA mittels Hitzeschock-Transformation in die Bakterien-Zellen eingebracht. Bakterien-Kolonien, welche das gewünschte Konstrukt enthielten, wurden zur Amplifikation der Plasmid-DNA in eine Flüssigkultur überführt.

Bestimmte Bakterien sind über den natürlichen Prozess der Transformation in der Lage extrazelluläre DNA, wie beispielsweise Resistenz-Plasmide, aufzunehmen und sich dadurch einen Selektionsvorteil zu verschaffen (COHEN et al., 1972; HOTCHKISS, GABOR, 1970). Im Falle von *Escherichia coli* (*E. coli*) kann eine Kompetenz zur Transformation jedoch auch artifiziell induziert werden. Dazu wird die Permeabilität der Bakterien-Zellwand erhöht, indem die Zellen bei 0 °C unter einer hohen Konzentration an zweiwertigen Kalzium- oder Magnesium-Ionen gehalten werden (BERGMANS et al., 1981; COHEN et al., 1972; MANDEL, HIGA, 1970). Die Aufnahme von extrazellulärer DNA wird dann durch einen kurzzeitigen Hitzeschock bei 42 °C induziert, gefolgt von einer schnellen Abkühlung auf 0 °C (BERGMANS et al., 1981).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden chemisch kompetente „NEB® 5-alpha Competent *E. coli*“ der Firma New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Vor der Benutzung wurden diese bei -80 °C gelagert. Für die Hitzeschock-Transformation wurde ein 10 µl Aliquot der Bakteriensuspension für 5 min auf Eis aufgetaut und anschließend für 1 h mit 1 µl des Ligationsansatzes inkubiert. Die Aufnahme der extrazellulären Plasmid-DNA wurde durch einen Hitzeschock (30 sec bei 42 °C) induziert. Die Zellen wurden für 2 min auf Eis abgekühlt, mit 100 µl des mitgelieferten, flüssigen SOC-Mediums (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) versetzt und für 1 h bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Im Folgenden wurden die Bakterien über Nacht bei 37 °C auf LB (*Lysogeny Broth*)-Agarplatten mit 0,1 % (w/v) Ampicillin kultiviert. Die Transformanten wurden dabei über eine Plasmid vermittelte Ampicillin-Resistenz selektiert. Am folgenden Tag wurden Kolonien, welche das gewünschte Vektorkonstrukt enthielten, mittels Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion ermittelt. Entsprechende Transformanten wurden zur Amplifikation der Plasmide in eine 50 ml Flüssigkultur mit LB-Medium (0,1 % (w/v) Ampicillin) inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert.

3.5. DNA-basierte Methoden

3.5.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Sequenzen

Im Rahmen der Klonierung wurde zur gezielten Amplifikation von 3'UTR-Sequenzen das *in vitro* Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) genutzt.

Bei der PCR werden spezifische Nukleinsäure-Sequenzen mithilfe von freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und sequenzflankierenden Oligonukleotiden, die als Ansatzpunkte (*Primer*) für die Enzymaktivität einer thermostabilen DNA-Polymerase dienen, repliziert (GARIBYAN, AVASHIA, 2013; MULLIS, FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988). Als thermostabile Polymerase wird in der Regel die sogenannte *Taq*-Polymerase, die ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) stammt, verwendet (SAIKI et al., 1988). Als Ausgangsmatrize für die Polymerase dient eine DNA oder cDNA (*complementary DNA*) Vorlage (GARIBYAN, AVASHIA, 2013; HEID et al., 1996). Durch die zyklische Wiederholung eines Temperatur-Programmes, welches mit der Doppelstrang-Trennung (Denaturierung), der Anlagerung der *Primer* (*Annealing*) und der anschließenden Aktivität der *Taq*-Polymerase (Elongation) einhergeht, kann die Zielsequenz nahezu exponentiell amplifiziert werden. Dabei dient jedes Amplikon im folgenden Zyklus wieder als Matrize (GARIBYAN, AVASHIA, 2013; MULLIS, FALOONA, 1987).

Für die Amplifikation von zellulären 3'UTR-Sequenzen wurde cDNA aus der humanen T-Zelllinie Jurkat in die PCR eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden nach **Tabelle 7** hergestellt und die Temperaturbehandlung entsprechend der Darstellung in **Tabelle 8** durchgeführt. Dazu wurden eine *Taq*-DNA-Polymerase („DNA Polymerase from *Thermus aquaticus*“; mit zugehörigem 10x Reaktionspuffer mit MgCl₂) der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) und ein „peqSTAR 2x Thermocycler“ der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) verwendet.

3. Material und Methoden

Tabelle 7: Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes der Polymerase-Kettenreaktion.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration/ finale Menge
10x PCR-Reaktionspuffer	5 μ l	1x
dNTP-Mix	2 μ l	Je 100 mM
<i>Primer For</i>	1 μ l	0,5 ng/ μ l
<i>Primer Rev</i>	1 μ l	0,5 ng/ μ l
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 μ l	2,5 U/ μ l
cDNA	x μ l	500 ng
Nuklease-freies Wasser	x μ l	Ad 50 μ l

Tabelle 8: Temperaturprogramm zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion.

Die Dauer der Elongationsphase wurde der Länge des zu amplifizierenden Sequenzabschnittes angepasst.

PCR-Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	50 s	38x
<i>Annealing</i>	58-60 °C	1 min	
Elongation	72 °C	(1 min/1000 bp)	
Finale Elongation	72 °C	3 ×(1 min/1000 bp)	
Ende	8 °C	∞	

3.5.2. Kolonie-PCR zur Identifizierung von erfolgreich transformierten Bakterien

Um die transformierten Bakterien auf das Vorhandensein des pMIR-RNL-TK-Reporter-Plasmids und die erwartete Größe des gewünschten 3'UTR-*Inserts* zu testen, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt.

3. Material und Methoden

Bei einer Kolonie-PCR kann die bakterielle DNA ohne vorherige Isolation aus der Zelle heraus amplifiziert werden (HOFMANN, BRIAN, 1993). Dazu werden einzelne Bakterien-Kolonien mithilfe eines sterilen Zahnstochers in einen PCR-Reaktionsansatz mit Polylinker-Region-spezifischen *Primer*-Paaren überführt (GUSSOW, CLACKSON, 1989; HOFMANN, BRIAN, 1993; SANDHU et al., 1989). Durch die initiale Denaturierungsphase des Temperatur-Programmes werden die Zellen lysiert, so dass die freigesetzte Plasmid-DNA im Folgenden als Matrize bei der PCR dienen kann (GUSSOW, CLACKSON, 1989; SANDHU et al., 1989).

Die Kolonie-PCRs (**Tabelle 9** und **Tabelle 10**) wurden in einem Volumen von 25 μl und mit *Primer*-Paaren zur Amplifikation der pMIR-RNL-TK Polylinker-Region durchgeführt. Die Ergebnisse der Kolonie-PCR wurden anschließend in einer Agarosegelelektrophorese überprüft. Erfolgreich transformierte Kolonien wurden als Inokulum einer Flüssigkultur verwendet und zur Amplifikation des jeweiligen Plasmides in größerem Maßstab angezogen.

Tabelle 9: Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes der Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion.

Die Reaktion wurde mit *Primer*-Paaren für die Amplifikation der pMIR-RNL-TK Polylinker-Region durchgeführt.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration/ Finale Menge
10x PCR-Reaktionspuffer	2,5 μl	1x
dNTP-Mix	1 μl	Je 100 mM
<i>Primer</i> For	0,5 μl	0,5 ng/ μl
<i>Primer</i> Rev	0,5 μl	0,5 ng/ μl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,25 μl	2,5 U/ μl
DNA Matrize	Bakterien-Kolonie	
Nuklease-freies Wasser	20,25 μl	Ad 25 μl

Tabelle 10: Temperaturprogramm zur Durchführung der Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion.

Die Dauer der Elongationsphase wurde der Länge des zu amplifizierenden Sequenzabschnittes angepasst. Dabei wurden, zusätzlich zur 3'UTR-Sequenz, 235 bp der umliegenden pMIR-RNL-TK-Region amplifiziert.

PCR-Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	50 s	27x
<i>Annealing</i>	58-60 °C	1 min	
Elongation	72 °C	(1 min/1000 bp)	
Finale Elongation	72 °C	3 ×(1 min/1000 bp)	
Ende	8 °C	∞	

3.5.3. Zielgerichtete Mutagenese potenzieller miRNA-Bindestellen mittels Overlap Extension PCR

Im Rahmen einer Mutagenese mittels *Overlap Extension PCR* (OE-PCR) können DNA-Sequenzen gezielt verändert werden (HO et al., 1989). In dieser Arbeit wurde die OE-PCR genutzt, um vorhergesagte Bindestellen der miR-155-5p in 3'UTR-Reporterplasmiden zu mutieren und durch Sequenzabschnitte mit gleicher Anzahl an Basenpaaren zu ersetzen.

Bei der zweistufigen OE-PCR werden periphere *Primer*-Paare und zwei überlappenden Mutagenese-*Primer* des oberen und unteren Matrizen-Stranges, welche die zu mutierenden Sequenzabschnitten tragen, gezielt kombiniert. Es entstehen zunächst zwei doppelsträngige Teilstücken der zu mutierenden Gesamt-Sequenz, die an ihrem überlappenden Sequenzende die gewünschte Sequenzänderung tragen (HO et al., 1989). In einer sekundären PCR mit den peripheren *Primern* werden dann die primären PCR-Produkte als Matrizen genutzt und zur mutierten Gesamtsequenz fusioniert (HO et al., 1989). Ein schematischer Überblick zur OE-PCR ist auf der nachfolgenden Seite in **Abbildung 7** dargestellt.

3. Material und Methoden

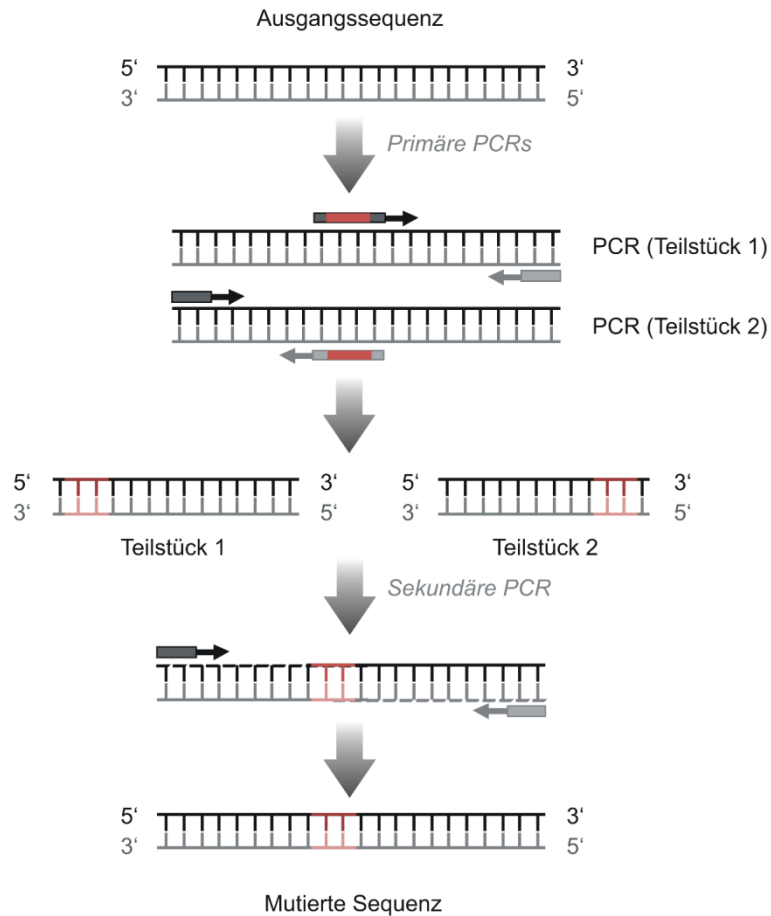


Abbildung 7: Schematischer Überblick einer *Overlap Extension PCR*.

Die Zielsequenz wird in zwei primären PCRs durch die gezielte Kombination von peripheren *Primer*-Paaren und Oligonukleotid-*Primern* mit den zu mutierenden Sequenzabschnitten (rot) amplifiziert. In einer weiteren PCR mit den peripheren *Primern* werden dann die überlappenden, mutierten Teilstücke der primären Amplifikation als Matrizen genutzt und zur mutierten Gesamtsequenz kombiniert. (*Primer* sind in 5'→3' Orientierung in Pfeilrichtung dargestellt). (Eigene Darstellung nach (HO et al., 1989))

Für die Mutagenese der 3'UTR-Reporterplasmide wurden Reporterkonstrukte mit der Wildtyp-3'UTR als Matrize bei den primären OE-PCRs genutzt. Es wurden Mutagenese-*Primer* mit den gewünschten Sequenzveränderungen in Kombination mit den peripheren Klonierungs-*Primer* verwendet. Die entstandenen Teilstücke wurden auf Agarosegelen aufgetrennt, reisoliert und zu jeweils 5 µl ohne vorherige Konzentrationsbestimmung in die sekundäre PCR mit den Klonierungs-*Primern* eingesetzt. Die Reaktionsansätze und das Temperaturprogramm entsprechen der Beschreibung in Abschnitt 3.5.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Sequenzen.

3.5.4. Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Proben und zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mit bestimmter Basenpaarlänge wurde das Verfahren der Gelelektrophorese angewandt.

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wird in der Regel eine polymere Agarose-Gelmatrix verwendet (LEE et al., 2012; SMITH, 1993). Beim Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes wandern die Nukleinsäure-Moleküle aufgrund der negativen Ladung ihres Phosphat-Rückgrats durch die Gel-Poren in Richtung der Anode. Die Migrationsgeschwindigkeit wird dabei durch die molekulare Masse und die Konformation der Sequenzen bestimmt (LEE et al., 2012). Mithilfe von interkalierenden Farbstoffen, wie beispielsweise Ethidiumbromid, können die aufgetrennten DNA-Fragmente anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (GREEN, SAMBROOK, 2019; LEE et al., 2012). Durch das Mitführen eines Größenstandards (*Marker*) mit DNA-Sequenzabschnitten bekannter Größe, können die detektierten Banden anhand ihrer molekulare Masse zugeordnet werden (VOYTAS, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Proben in Gelen mit einem Agaroseanteil von 1,5 % (w/v), in 1x TAE (Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat)-Puffer und bei 150 V aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Auftragen in einem Volumen-Verhältnis von eins zu sechs mit Ladedpuffer (6x Gel Loading Dye Purple Buffer; New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) versetzt. Als Größenstandard wurde die „Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder“ (0,1-10,0 kbp) der Firma New England BioLabs GmbH mitgeführt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde bei der Herstellung der Gelmatrix der DNA-interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) zugesetzt. Die Banden wurden unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht. (DeVision DBOX-Gerät, Decon Science Tec GmbH, Hohengandern, Deutschland). Um eine UV-bedingte Schädigung von DNA-Fragmenten, welche anschließend zur Klonierung weiterverwendet werden sollten, zu vermeiden, wurde die entsprechenden Gelstücke so kurz wie möglich mit UV-Licht höherer Wellenlänge (365 nm) belichtet und die Banden für die weitere Bearbeitung mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

3.5.5. Restriktionsverdau zur enzymatischen Spaltung von DNA

Um die 3'-UTR-Sequenzen im Rahmen der Klonierung gerichtet in das pMIR-RNL-TK-Reporterplasmid zu inserieren, wurden die *Insert*-Sequenzen ebenso wie die Polylinker-Region des leeren Reporterplasmids durch die Restriktionsenzyme *SpeI* und *SacI* geschnitten.

Zudem wurden mutierte 3'UTR-Plasmide, bei denen potenzielle miRNA-Bindestellen durch Schnittstellen des Restriktionsenzym *NruI* ersetzt wurden mittels Restriktionsverdau und anschließender Agarosegelelektrophorese des linearisierten Vektors auf den Erfolg der Mutagenese überprüft.

Restriktionsendonukleasen bilden zusammen mit DNA-modifizierenden Enzymen sogenannte Restriktions-Modifikations Systeme. Diese dienen in prokaryontischen Zellen dem Schutz vor zellfremder DNA, die anhand von fehlenden Modifikationen an palindromischen, 4-8 nt langen Erkennungssequenzen von den Restriktionsenzymen identifiziert und geschnitten werden kann (PINGOUD et al., 2005; WILSON, 1991). Im Falle der hier verwendeten Restriktionsenzyme entstehen dabei durch versetzte Schnitte am DNA-Doppelstrang 5' bzw. 3' Sequenzüberhänge, die als *sticky ends* bezeichnet werden (HOSEINI, SAUER, 2015; ROBERTS, 1982; WILSON, 1991). Indem zwei DNA-Moleküle mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten werden, können die *sticky ends* genutzt werden, um diese mithilfe der kohäsiven Sequenzenden in einem *in vitro* Ligations-Verfahren zu rekombinanten DNA-Molekülen zu verbinden (DELIDOW, 1997; HUNG, WENSINK, 1984; MERTZ, DAVIS, 1972). Um bei der Verbindung zwischen Plasmid und *Insert* eine Rezirkularisierung des Restriktionsenzym geschnittenen Vektors im Rahmen der Ligationsreaktion zu vermeiden, kann zusätzlich eine 5'-Dephosphorylierung der Plasmid-DNA mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase durchgeführt werden (HOFFMAN, JENDRISAK, 1990).

Der zeitgleiche Restriktionsverdau von DNA mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *SacI* (High-Fidelity/HF-Enzyme) wurde nach Herstellerempfehlungen (New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) für 2-12 h bei 37°C und unter den Pufferbedingungen des Hersteller-Puffers (Reaktionspuffer: „CutSmart Buffer“) durchgeführt. Wegen einer *SpeI*-Schnittstelle innerhalb der Sequenz wurde zur Klonierung der *IL1RAP*-3'UTR anstelle von *SpeI* das Restriktionsenzym *NgoMIV* (New England BioLabs GmbH) unter gleichbleibenden Reaktionsbedingungen verwendet. Beim Verdau der Plasmid-DNA wurde zusätzlich eine alkalische Phosphatase („rAPid Alkaline Phosphatase“, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) mitgeführt. Die entsprechenden Reaktionsansätze sind in **Tabelle 11** aufgeführt. Nach dem Restriktionsverdau wurden Plasmid- und *Insert*-DNA von den Enzymresten gereinigt und anschließend ligiert.

3. Material und Methoden

Für den Verdau der mutierten 3'UTR-Konstrukte wurde ein 2 µg-Aliquot der Plasmid-DNA mit 1 µl *NruI*-HF und 2 µl des entsprechenden „CutSmart“-Puffers (New England BioLabs GmbH) in einem Endvolumen von 20 µl (Nuklease-freies Wasser ad 20 µl) über Nacht bei 37 °C verdaut.

Tabelle 11: Zusammensetzung des typischen Reaktionsansatzes zur enzymatischen Spaltung von DNA mittels Restriktionsverdau.

A) Reaktionsansatz zum Verdau des leeren pMIR-RNL-TK- Reporterplasmids.

Reagenz	Volumen
<i>SpeI</i> -HF	1 µl
<i>SacI</i> -HF	1 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
Plasmid-DNA	2 µl (≡ 2 µg)
Alkalische Phosphatase	1 µl
Nuklease-freies Wasser (Ad 20 µl)	13 µl

B) Reaktionsansatz zum Verdau der *Insert*-DNA.

Reagenz	Volumen
<i>SpeI</i> -HF	1 µl
<i>SacI</i> -HF	1 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
<i>Insert</i> -DNA	16 µl

3.5.6. Ligation von DNA-Fragmenten

Die gereinigte Plasmid- und *Insert*-DNA aus den Reaktionsansätzen des jeweiligen Restriktionsverdau wurden in einen Ligationsansatz mit der T4 DNA Ligase eingesetzt.

Die T4-Ligase entstammt ursprünglich dem Bakteriophagen T4 (LEHMAN, 1974). Im Falle von Einzelstrangbrüchen innerhalb von DNA-Doppelsträngen kann sie in einer ATP-abhängigen Reaktion Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphoryl- und 3'-Hydroxyl-Gruppen bilden (LEHMAN, 1974). Auf Grundlage dessen können zwei DNA-Moleküle mit kohäsiven Sequenzenden *in vitro* durch die T4-DNA-Ligase zu rekombinanten DNA-Molekülen verbunden werden (DELIDOW, 1997; HUNG, WENSINK, 1984; LEHMAN, 1974).

Die Zusammensetzung des im Rahmen der Klonierung verwendeten Ligationsansätze ist in **Tabelle 12** zusammengefasst. Die T4 DNA Ligase und der T4 DNA Ligase Puffer (10x, mit 1 mM ATP) wurden von der Firma New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. Nach einer Inkubation von 12 h bei 4 °C wurden die Ligationsansätze zur Transformation von chemisch kompetenten Bakterien verwendet.

Tabelle 12: Zusammensetzung des typischen Reaktionsansatzes zur Ligation von *Insert*-DNA und pMIR-RNL-TK-Reporterplasmid.

Reagenz	Volumen
10x T4 DNA Ligase Puffer	1 µl
T4 DNA Ligase (400 U/µl)	1 µl
Plasmid-DNA (pMIR-RNL-TK)	1 µl
<i>Insert</i> -DNA	7 µl
Gesamt Volumen	10 µl

3.5.7. Isolation von DNA-Proben aus Enzym-Reaktionen und Agarosegelen

Zur Rückgewinnung und zur Reinigung von DNA-Fragmenten wurde das „NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up Kit“ der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) verwendet. Dieses basiert methodisch auf einer Adsorption der DNA an eine Silica-Membran und ermöglicht im kleinen Maßstab die Reinigung von Proben aus Enzym-Reaktionen und Agarosegelen.

Die DNA-Probe wird dazu zunächst durch die Zugabe hochkonzentrierter, chaotroper Salze, wie beispielsweise Guanidiniumthiocyanat, an immobilisierte Silica- oder Glas-Partikel gebunden (BOOM et al., 1990; VANDEVENTER et al., 2013). Das Guanidiniumthiocyanat sorgt zudem für die Denaturierung von Proteinen innerhalb der Probe (BOOM et al., 1990). Durch das Waschen mit ethanolhaltigen Puffern können Verunreinigungen entfernt werden. Bei geringer Ionenstärke und leicht alkalischem pH-Wert wird die DNA-Probe schließlich mittels Ionenaustausch von der Säule eluiert (BOOM et al., 1990; VANDEVENTER et al., 2013).

Die Vorgehensweise zur Reinigung des Restriktionsverdau entsprach dem „PCR clean-up“ Protokoll des Herstellers. Zur Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus den Agarosegelen wurde nach dem „gel extraction“ Protokoll vorgegangen. Im Anschluss an die Elution wurden die Proben zum Entfernen von Ethanol-Resten in einer „UNIVAPO 100 H“ Vakuumzentrifuge (Uniequip Laborgerätebau und Vertriebs GmbH, Planegg, Deutschland) eingedampft und die DNA in 20 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst.

3.5.8. Isolation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurde das „NucleoBond® PC 100 (Midi) Kit“ nach dem Protokoll der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) verwendet. Dieses basiert auf dem Verfahren der Anionenaustausch-Chromatographie.

Dazu werden die Plasmide zunächst aus den Bakterienzellen extrahiert. Dies kann mittels alkalischer Lyse erreicht werden (BIRNBOIM, DOLY, 1979; TIAINEN et al., 2007). Dabei findet unter alkalischen Bedingungen eine selektive Denaturierung der chromosomalen DNA statt, während die Plasmid-DNA als zirkulärer Doppelstrang erhalten bleibt (BIRNBOIM, DOLY, 1979). Durch die anschließende Neutralisierung der Lösung, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt, kann so die genomische DNA als unlösliches Pellet von der löslichen Plasmid-DNA getrennt werden (BIRNBOIM, DOLY, 1979). Die Plasmid-DNA des Überstandes wird im Folgenden auf Grundlage der negativen Ladung ihres Phosphatrückgrats an eine positiv geladene Säulenmatrix gebunden (DIOGO et al., 2005), 9639879). Nach mehrmaligem Waschen mit alkoholhaltigen Puffern zum Entfernen von RNA- und Proteinverunreinigungen, können die Plasmide durch Erhöhung der Salzkonzentration wieder von der Säule eluiert

werden (DIOGO et al., 2005; PRAZERES et al., 1998; TSENG, HO, 2003). Zum Schluss wird die isolierte DNA beispielsweise durch das Hinzufügen von Isopropanol mit anschließender Zentrifugation präzipitiert (TSENG, HO, 2003).

Abweichend zum Protokoll des „NucleoBond® PC 100 (Midi) Kits“ wurden in dieser Arbeit für jeden Waschschrift 5 ml Waschpuffer verwendet. Die Zentrifugation fand bei 5000 rpm statt. Das Isopropanol-präzipitierte Plasmid-Pellet wurde in einem abschließenden Waschschrift nach Herstellerangaben mit Ethanol gewaschen und in 50 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst. Die resultierende DNA-Konzentration wurde im Folgenden spektrophotometrisch bestimmt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 1 µg/µl eingestellt.

3.5.9. Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Proben wurde in dieser Arbeit anhand einer spektrophotometrischen Vermessung bestimmt.

Diese Art der Konzentrationsbestimmung basiert auf einer Messung des UV-Licht-Absorptionsspektrums bei Wellenlängen zwischen 200-320 nm (OLSON, MORROW, 2012). Aufgrund von Doppelbindungen innerhalb der Nukleotid-Basen, absorbieren Nukleinsäuren Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. Entsprechende Messgeräte bestimmen daher das Absorptionsmaximum bei 260 nm (A_{260}), welches mit zunehmender Nukleinsäure-Konzentration ansteigt (LI et al., 2014). So kann bei einem Einsatz von wenigen Mikrolitern des Probevolumens und mithilfe des Bouguer-Lambert-Beer'schen Gesetzes eine Konzentrationsbestimmung ermöglicht werden (HE et al., 2018; MANTELE, DENIZ, 2017). Zudem können mithilfe des Spektrophotometers die Absorptionsmaxima bei 230 nm (A_{230}) und 280 nm (A_{280}) bestimmt werden, welche Informationen über die Verunreinigung der Probe mit Chemikalien-Rückständen und Proteinen liefern. Bei einer A_{260}/A_{230} Rate zwischen 1,8 und 2,2 und einer A_{260}/A_{280} Rate zwischen 1,8 und 2,0 kann von einer guten Reinheit der DNA-Probe ausgegangen werden (OLSON, MORROW, 2012).

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit wurde 1 µl der jeweiligen Probe mit Hilfe des „NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometers“ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) vermessen. Als Referenz wurde eine Probe des Lösungsmittels (in der Regel Nuklease-freies Wasser) vermessen. Die DNA-Konzentration wurde durch die zugehörige Software bei einem Extinktionskoeffizienten von 50 ng-cm/µl bestimmt.

3.5.10. Sequenzierung rekombinanter Reporterplasmide

Die inserierten Sequenzen der klonierten 3'UTR-Reporterkonstrukte wurden mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung wurde als externe Dienstleistung durch die Firmen SEQ-IT GmbH & Co. KG (Kaiserslautern, Deutschland) oder Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland; Mix2Seq) durchgeführt. Dabei wurden die pMIR-*Primer* als Sequenzierungs-*Primer* zur Analyse der Polylinker-Region des jeweiligen pMIR-RNL-TK-3'UTR-Konstruktes verwendet. Die Sequenzierungsdaten wurden mir zur Verfügung gestellt.

Die Korrektheit des jeweiligen 3'UTR-*Inserts* wurde anschließend durch einen Abgleich mit der entsprechenden Sequenzvorlage des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) verifiziert. Dazu wurde das „Nucleotide BLAST“ *Tool* (NCBI) genutzt. Zusätzlich wurden die Sequenzierungsergebnisse an den vorhergesagten miRNA-Bindestellen anhand des zugehörigen Chromatogramms mithilfe der Software „FinchTV“ (PerkinElmer) überprüft.

3.6. RNA-basierte Methoden

3.6.1. Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion von zellulärer RNA

Zelluläre (Gesamt-)RNA wurde auf Grundlage der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode isoliert.

Bei diesem Verfahren wird die RNA bei saurem pH-Wert mithilfe von Lösungen aus Guanidiniumthiocyanat, Natriumacetat, Phenol und Chloroform extrahiert (CHOMCZYNSKI, SACCHI, 1987, 2006). Das Salz Guanidiniumthiocyanat sorgt dabei für die Denaturierung von Ribonukleasen und so für eine Stabilisierung der RNA (CHOMCZYNSKI, SACCHI, 2006). In einem zwei Phasen Gemisch aus Phenol und Chloroform verbleiben die Nukleinsäuren nach Zentrifugation in der oberen wässrigen Phase, während sich zelluläre Bestandteile, wie Proteine und Lipide, in der unteren hydrophoben Phase sammeln. Unter sauren Reaktionsbedingungen wird die DNA als zusätzliche Schicht zwischen der wässrigen und hydrophoben Phase abgeschieden (CHOMCZYNSKI, SACCHI, 1987, 2006; TAN, YIAP, 2009). Die RNA bleibt hingegen in der oberen wässrigen Phase gelöst und kann, nach dem Überführen dieser Schicht, mithilfe von Isopropanol präzipitiert werden. Durch mehrmaliges Waschen mit Ethanolhaltigen Lösungen kann die Reinheit der RNA zusätzlich verbessert werden (CHOMCZYNSKI, SACCHI, 1987, 2006; TONI et al., 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Isolation der zellulären RNA das „miRNeasy Micro Kit“ und das „QIAcube robot systems“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Anstelle der Isopropanol-Fällung wurde die RNA dabei mithilfe einer RNA bindenden Säule immobilisiert und nach dem Waschen durch die Zugabe von 15 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

3.6.2. Fluorometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration von zellulären RNA-Proben wurde mittels fluorometrischer Messung bestimmt. Diese Art der Konzentrationsbestimmung ermöglicht eine präzise Quantifizierung auf Grundlage von RNA spezifischen Farbstoffen, welche bei Bindung an die RNA ein messbares Fluoreszenzsignal generieren (LI et al., 2015; SCHMIDT, ERNST, 1995).

Es wurden das „Qubit RNA HS Assay Kit“ sowie das „Qubit 4“ Fluorometer der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) nach Herstellerangaben genutzt. Dabei wurde durch das Fluorometer die RNA-Konzentration der Proben im Vergleich zu den Fluoreszenzsignalen der im Kit enthaltenen Referenzstandards bestimmt.

3.6.3. Bestimmung der RNA-Integrität

Zur Kontrolle der RNA-Integrität wurden die zellulären RNA-Proben mithilfe des „Agilent 2100 Bioanalyzer Instruments“ und dem „RNA Pico Kit“ der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten) überprüft.

Bei dem zugehörigen mikrofluiden Elektrophorese-Verfahren erfolgt zunächst eine Größenauffrennung der RNA-Fragmente innerhalb der Gelmatrix eines kapillären Chip-Systems (DAVIES et al., 2016; MUELLER et al., 2000). Aufgrund ihrer negativen Ladung und in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse wandern die RNA-Moleküle bei der elektrophoretischen Auftrennung im Spannungsfeld mit bestimmter Geschwindigkeit durch die Gelporen in Richtung der Anode (RIO et al., 2010). Im Folgenden können die RNA-Fragmente durch die Fluoreszenzanregung interkalierender Farbstoffe detektiert werden (DAVIES et al., 2016; MUELLER et al., 2000). Durch die Zugabe eines Markerfragments mit definierter Größe und das Mitführen eines Größenstandards konnten die RNA-Fragmente bestimmten Nukleotidlängen zugeordnet werden (DAVIES et al., 2016; MASOTTI, PRECKEL, 2006; SCHROEDER et al., 2006). Die zelluläre RNA wird anschließend in verschiedene RIN (RNA integrity number)-Kategorien eingeteilt, die mit zunehmender Degradation von den Werten 10 bis 1 reichen. Diese werden durch die automatisierte Zuordnung von Signalintensitäten der ribosomalen RNAs (28S und 18S rRNAs) bestimmt. Eine fortschreitende Degradation der RNA geht dabei mit einer Abnahme der rRNA-Signale und einer Zunahme kleinerer RNA-Fragmente einher (SCHROEDER et al., 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Experimente wurden die zellulären RNA-Proben zunächst in einem Verhältnis von 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt, um innerhalb des quantifizierbaren Bereichs des verwendeten Kits zu liegen. Anschließend wurde 1 µl der verdünnten Proben nach Angaben des Hersteller-Protokolls elektrophoretisch analysiert. Die zugehörigen RIN-Kategorien der einzelnen Proben wurden auf Grundlage der Elektropherogramme durch die zugehörige „Bioanalyzer 2100 Expert“ Software ermittelt (DAVIES et al., 2016; MUELLER et al., 2000; SCHROEDER et al., 2006).

3.6.4. Herstellung einer cDNA-Bank mittels reverser Transkription

Für die Klonierung von 3'-UTR-Sequenzen wurden RNA-Isolate aus der humanen Jurkat T-Zelllinie mittels reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Matritze für die DNA-abhängige *Taq*-Polymerase bei der Polymerasekettenreaktion.

Die Umschreibung von zellulärer RNA in cDNA kann enzymatisch durch eine Reverse Transkriptase katalysiert werden. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase bildet unter Verwendung von freien dNTPs den revers-komplementären Gegenstrang zu einer RNA-Matrize (GUBLER, HOFFMAN, 1983; OKAYAMA, BERG, 1982).

Für die Herstellung von cDNA-Banken werden universelle *Primer* bei der reversen Transkriptions-Reaktion genutzt. Ein Beispiel dafür sind oligomere Desoxythymidin (Oligo(dT)) *Primer*, die an das 3'-Polyadenylierungssignal von mRNAs binden. Die resultierende cDNA-Bank repräsentiert dann die revers-komplementären Sequenzabschnitte der reifen mRNAs aus der Probe, einschließlich der zugehörigen 3'UTR-Sequenzbereiche (GUBLER, HOFFMAN, 1983; OKAYAMA, BERG, 1982).

Zur Herstellung einer cDNA-Bank wurde Jurkat-RNA (~2 µg) unter Verwendung des „Omniscrypt RT“ Kits (Qiagen N.V.) und Oligo(dT)-*Primern* (Invitrogen Oligo(dT) 12-18 Primer, Thermo Fisher Scientific) revers transkribiert. Dabei wurde dem Reaktionsansatz ein RNase-Inhibitor (RNase Out™, Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt, um die Stabilität der RNA-Matrize während der Reaktion zu gewährleisten. Der Reaktionsansatz wurde entsprechend der Anleitung des „Omniscrypt Reverse Transcription Kit“ Protokolls (Firma Qiagen N.V, Hilden, Deutschland) zusammengestellt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Dazu wurde ein „peqSTAR 2x Thermocycler“ der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) genutzt. Die Konzentration der cDNA wurde im Anschluss spektrophotometrisch bestimmt.

3.6.5. Hoch-Durchsatz-Analyse von mRNA- und miRNA-Expressionsprofilen auf Grundlage des Microarray-Verfahrens

Die mRNA- und miRNA-Expressionsprofile auf Grundlage der RNA-Zeitverlaufsproben der Spender 1 und 2 wurden mittels Microarray analysiert.

Das Hoch-Durchsatz Verfahren des Microarrays ermöglicht die simultane Analyse verschiedenster Transkripte (CONSORTIUM et al., 2006; GUO et al., 2013). Dabei kann mithilfe spezialisierter Testsysteme die Expression von bis zu mehreren zehntausend unterschiedlichen Transkripten parallel untersucht werden (D'ANDRADE, FULMER-SMENTEK, 2012; GOVINDARAJAN et al., 2012). Das Analyse-Verfahren macht sich den Mechanismus der molekularen Hybridisierung zunutze. Aus zwei Nukleinsäure-Molekülen mit komplementärer Sequenz wird dabei ein Doppelstrang gebildet, wobei die Sequenzspezifität der Hybridisierungsreaktion durch die umgebende Temperatur und Salzkonzentration definiert wird (MCCARTHY, CHURCH, 1970; THOMPSON, GILLESPIE, 1990).

Bei der Microarray-Untersuchung werden die Ziel-Nukleinsäure-Moleküle zunächst mit fluoreszierenden Farbstoffen, wie beispielsweise dem Cyaninfarbstoffe Cy3, markiert und anschließend in einer stringenten Hybridisierungsreaktion an Oligonukleotide mit komplementärer Sequenz gebunden, die zuvor mit definierter Position auf dem Trägermaterial des Array-Chips immobilisiert wurden (BARRETT, KAWASAKI, 2003; GOVINDARAJAN et al., 2012). Die *Scanner*-Detektion der Fluoreszenzsignale liefert Informationen über das Vorhandensein der Zielsequenzen und den Umfang der Expression innerhalb der Probe (BARRETT, KAWASAKI, 2003; D'ANDRADE, FULMER-SMENTEK, 2012; GOVINDARAJAN et al., 2012). Ein schematischer Überblick zum Grundprinzip des Microarray-Verfahrens ist nachfolgend in **Abbildung 8** zusammengefasst.

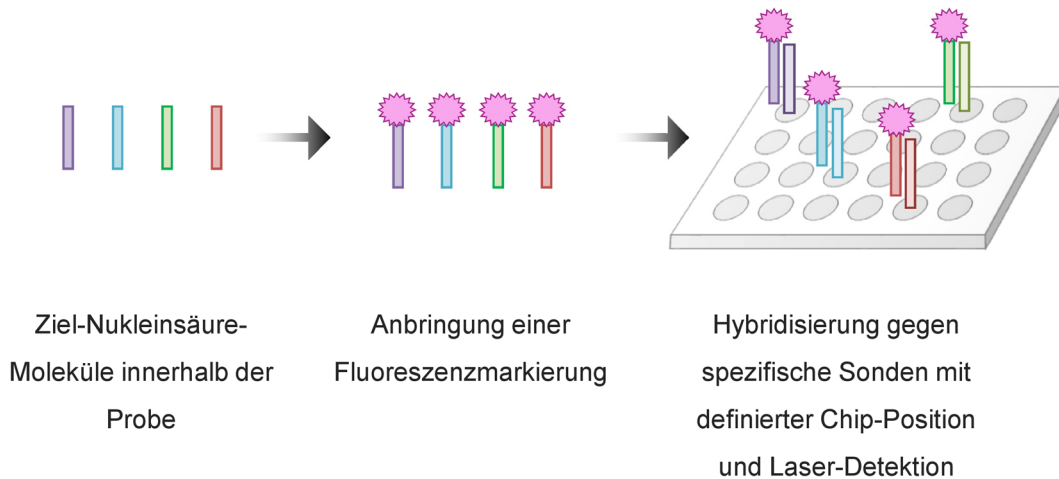


Abbildung 8: Schematischer Überblick zum Grundprinzip des Microarray-Verfahrens.

Die Ziel-Nukleinsäure-Moleküle innerhalb der Probe werden durch die Anbringung eines fluoreszierenden Farbstoffes markiert. In einer Hybridisierungsreaktion werden sie anschließend an Oligonukleotid-Sonden mit komplementärer Sequenz gebunden, die mit definierter Position am Trägermaterial des Array-Chips immobilisiert sind. Die Detektion erfolgt mittels *Laser-Scan*. (Eigene Darstellung in Anlehnung an (PRITCHARD et al., 2012))

3.6.5.1. Analyse von mRNA-Expressionsprofilen

Aufgrund ihrer geringen Stabilität müssen mRNAs für die Analyse mittels Microarray zunächst mithilfe von universellen *Primern* in einer reversen Transkriptionsreaktion (RT) zu stabileren cDNA Molekülen umgeschrieben werden (BARRETT, KAWASAKI, 2003; GOVINDARAJAN et al., 2012). Aufgrund der geringen Expressionsmenge von verschiedenen mRNAs, können auf Grundlage der cDNA-Bank in einem weiteren Amplifikationsschritt sogenannte *antisense RNAs* (aRNAs bzw. *complementary RNAs/cRNAs*) generiert werden, um somit die Signalstärke zu erhöhen und eine sensitivere Detektion zu ermöglichen (BUMGARNER, 2013; KERKHOVEN et al., 2008; VAN GELDER et al., 1990). Dazu wird mithilfe der RT-*Primer* eine Promotor-Sequenz für die Funktion einer T7 RNA Polymerase an die cDNA angefügt (VAN GELDER et al., 1990).

Zur Untersuchung der zeitaufgelösten mRNA-Expressionsprofile wurden für jede Zeitverlaufsprobe 25 ng der zellulären RNA nach Herstellerangaben mithilfe des „Low Input Quick Amp Labeling Kit (One-Color)“ der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten) in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde auf Grundlage cDNA unter Verwendung von Cy3-gekoppelten Cytosin-Nukleotiden fluoreszenzmarkierte cRNA synthetisiert. Die Cy3-markierten cRNA-Proben wurden mithilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt und die cRNA-Konzentration sowie die Konzentration der Farbstoffmarkierung in spektrometrischer Analyse mithilfe des „NanoDrop™ 2000c“ Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) bestimmt. Für die Hybridisierung wurde das „Agilent Gene Expression Hybridization Kit in Kombination mit den Agilent Human SurePrint G3 Gene Expression (V3, G4851C)“ Microarray-Chips nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden je 600 ng der fluoreszenzmarkierten cRNA mit einer spezifischen Aktivität (\equiv pmol Cy3/ μ g cRNA) von ≥ 6 in die Reaktion eingesetzt. Für die Temperatur-Behandlungen wurde ein „peqSTAR 2x Thermocycler“ der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) verwendet. Die Hybridisierung fand entsprechend des Herstellerprotokolls für 17 h bei 65 °C und bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 10 rpm in einem „Agilent G2545A“ Hybridisierungssofen (Agilent Technologies) statt. Nach zwei abschließenden Waschschritten mit dem „Gene Expression Wash Buffer Kit“ (Waschpuffer 1 und 2 versetzt mit Triton X-102 zu je 0,005 %; Agilent Technologies) wurden die Array-Chips mit einer Auflösung von 3 μ m auf einem „SureScan Microarray Scanner“ der Firma Agilent Technologies gescannt. Die Rohdaten wurden mithilfe der zugehörigen „Agilent Feature Extraction Software“ extrahiert.

3.6.5.2. Analyse von miRNA-Expressionsprofilen

Die stabileren miRNAs können im Gegensatz zu mRNAs direkt und ohne Umschreibungsreaktion mittels Microarray untersucht werden. Bei dem vorliegenden Verfahren der Firma Agilent Technologies wird dazu eine Dephosphorylierungs-Reaktion vorgenommen und anschließend ein Cy3-markiertes Cytosin an das 3'-Ende der miRNA ligiert, um die Fluoreszenzmarkierung der miRNA vor der abschließenden Chip-Hybridisierung vorzunehmen (D'ANDRADE, FULMER-SMENTEK, 2012).

Zur Analyse der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsprofile wurden für jede Zeitverlaufsprobe 75 ng der zellulären RNA innerhalb des „miRNA Complete Labeling and Hyb Kits“ (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten) verwendet und gegen „Human SurePrint G3 Unrestricted miRNA 8x60K Array-Chips (Release 21.0, G4872A)“ hybridisiert. Für die Temperatur-Behandlungen wurde ein „peqSTAR 2x Thermocycler“ der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH verwendet. Die Hybridisierung fand entsprechend des Herstellerprotokolls für 20 h bei 55 °C und bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 20 rpm in einem „Agilent G2545A“ Hybridisierungssofen (Agilent Technologies) statt. Nach zwei abschließenden Waschschritten mit dem „Gene Expression Wash Buffer Kit“; (Waschpuffer 1 und 2 versetzt mit Triton X-102 zu je 0,005 %; Agilent Technologies) wurden die Array-Chips mit einer Auflösung von 3 µm auf einem „SureScan Microarray Scanner“ der Firma Agilent Technologies gescannt. Die Rohdaten wurden mithilfe der zugehörigen „Agilent Feature Extraction Software“ extrahiert.

3.6.6. Verfahren zur miRNA-Quantifizierung auf Grundlage der Microarray-Daten

Um aktivierungs-induzierte miRNA-Expressionsveränderungen quantitativ zu erfassen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methodik zur miRNA-Quantifizierung durch die Eichung des verwendeten Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten) miRNA-Microarray-Analysesystems etabliert.

3.6.6.1. Quantifizierung von miRNA-Expressionsveränderungen in Relation zum zellulären Ruhezustand

Um die relative Quantifizierung von miRNA-Expressionsveränderungen im Vergleich zum Ruhezustand (0 h) zu ermöglichen, wurden auf Basis der Microarray-Daten fünf exemplarische miRNAs mit unterschiedlichem Verlauf der zeitaufgelösten Expressionsmuster ausgewählt (hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-221-3p und hsa-miR-182-5p). Zur Eichung des Microarray-Systems wurden entsprechende, synthetische miRNA-Oligonukleotide als *spike-ins* zu verschiedenen Mengen (50, 500 und 1.000 amol) auf einzelne Reaktionsansätze verteilt. Um experimentell vergleichbare Bedingungen für die Generierung der Standardkurve zu erreichen, welche die spätere Anwendung auf die Zeitverlaufs-Daten erlauben würden, wurden die Microarray-Experimente vor dem Hintergrund (75 ng) einer T-zellulären RNA-Probe durchgeführt (RIN: 7,8). Diese entstammte einem Aliquot der kryokonservierten, inaktiven (0 h) CD4+ T-Zellen von Spender 1. Des Weiteren wurde ein Reaktionsansatz dieser Hintergrund-RNA ohne das Hinzufügen der Oligonukleotide vermessen. Zur Auswertung wurden die Rohsignale der Microarray-Analysen zunächst bezüglich des Hintergrundrauschens korrigiert (vergleiche Abschnitt zur bioinformatischen Prozessierung der Microarray-Daten). Anschließend wurde die relative Veränderung in der Signalstärke auf Grundlager der hinzugefügten *spike-in*-Menge bestimmt. Dazu wurde das Messergebnis der Hintergrund-RNA von dem der Array-Reaktionen mit den hinzugefügten Oligonukleotiden subtrahiert. Das Verhältnis zwischen dem Anstieg dieser relativen Signalwerte (Abszisse) und der Menge des jeweiligen miRNA *spike-ins* (Ordinate) wurde durch eine Ursprungsgerade dargestellt.

Die resultierenden Geraden-Gleichungen der untersuchten miRNAs wurden für die Quantifizierung von miRNA-Expressionsveränderungen auf die Zeitverlaufsdaten angewendet. Entsprechende relative Rohsignalwerte (Korrigiert) der zeitaufgelösten Microarray-Analysen wurden in Relation zu den korrigierten Rohsignalen der inaktiven CD4+ T-Zellen (0 h) bestimmt. Als Resultat wurde die relative Expressionsänderung der jeweiligen miRNA für die RNA-Menge des Microarray-Ansatzes ermittelt (\rightarrow Stoffmengenänderung [amol]/75 ng). Anschließend wurde für jeden Ansatz eine Hochrechnung auf die RNA-Gesamtmenge innerhalb der jeweiligen Zeitverlaufprobe (RNA-Gesamtmenge = Elutionsvolumen x RNA-Konzentration) vorgenommen (\rightarrow amol/Probe). Die enthaltene Molekülzahl wurde anhand der Avogadro-Konstanten ($N_A = 6,02214076 \times 10^{23}$ Teilchen (Moleküle)/mol) bestimmt (\rightarrow Moleküle/Probe). Veränderungen pro Zelle wurden unter der Annahme extrapoliert, dass die ausgesäte Zellzahl von $3,5 \times 10^5$ Zellen/Probe bei allen Zeitverlaufproben konstant blieb (\rightarrow Moleküle/Zelle).

3.6.6.2. Absolute Quantifizierung von miRNA-Expressionsmengen

Um die absolute Quantifizierung der miRNA-Expression zu ermöglichen, wurde die Eichung des Microarray-Systems vor dem Hintergrund einer nicht-kompetitiven RNA-Probe wiederholt. Dazu wurden, anstelle einer zellulären Hintergrund-RNA, 75 ng einer viralen RNA-Probe des MS2-Bakteriophagen (RNA, MS2) von der Firma Roche (Basel, Schweiz) verwendet. Diese sollte nicht an den Array-Chip binden und so das spätere Messergebnis nicht beeinflussen. Die miRNA-Oligonukleotide wurden als „*spike-ins*“ zu 50 amol, 500 amol, 1.000 amol, 2.000 amol und 5.000 amol auf die einzelnen Reaktionsansätze verteilt. Die Rohsignale der Microarray-Analysen wurden bezüglich des Hintergrundrauschens korrigiert. Es wurden Eichkurven zu fünf unterschiedlichen miRNAs erstellt (hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-221-3p und hsa-miR-182-5p). Der Zusammenhang zwischen den Microarraysignalwerten (Abszisse) und der jeweiligen Menge der miRNA *spike-ins* (Ordinate) wurde als quadratische Funktion dargestellt.

Zur Bestimmung einer universellen Eichkurve, wurden die Mittelwerte der korrigierten Rohsignalwerte aus den Ergebnissen von allen analysierten miRNA-Oligonukleotiden bestimmt. Der Zusammenhang zwischen diesen Durchschnittswerten (Abszisse) und der jeweiligen Menge der miRNA *spike-ins* (Ordinate) wurde als quadratische Funktion dargestellt. Die Übertragbarkeit der resultierenden universellen Eichkurve wurde in einem entsprechenden Kontrollexperiment überprüft. Dabei wurden weitere synthetische miRNAs (hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-150-5p und hsa-miR-223-3p) als *spike-ins* vor einem MS2-RNA-Hintergrund vermessen und mithilfe der Eichkurve quantifiziert.

Zur quantitativen Analyse der Zeitverlaufsdaten wurde die Kurven-Gleichung auf die korrigierten Rohsignalwerte der einzelnen Array-Reaktionen angewendet. Dabei wurde die jeweilige Menge aller 815 detektierten miRNAs innerhalb der Reaktionsansätze bestimmt (\rightarrow amol/75 ng). Des Weiteren wurde die Molekülzahl pro Zelle berechnet, wie bereits für die relative Quantifizierung beschrieben.

Die Auszählung zur anteiligen Verteilung der miRNAs erfolgte nach Bestimmung der maximalen Expressionsmenge bzw. nach Berechnung der maximalen Expressionsänderung anhand der gerundeten Molekülzahlen (ohne Dezimalstellen).

3.6.7. Validierung von zeitaufgelösten RNA-Expressionsprofilen durch Taqman-Analysen

Zur Validierung zeitaufgelösten miRNA-Expressionsprofile wurden miRNA-spezifische Taqman-Untersuchungen durchgeführt. Die verwendeten „TaqMan™ microRNA assays“ (Kombination aus RT-*Primer* und qPCR-Assays) wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) bezogen und sind in **Tabelle 13** zusammengefasst.

Tabelle 13: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TaqMan™ microRNA assays.

Ziel-miRNA	Assay-ID (Thermo Fisher Scientific Inc.)
hsa-let-7b-5p	002619
hsa-miR-17-5p	002308
hsa-miR-20a-5p	000580
hsa-miR-21-5p	000397
hsa-miR-26a-5p	000405
hsa-miR-132-3p	000457
hsa-miR-155-5p	002623
hsa-miR-221-3p	000524
hsa-miR-223-3p	002295

Das Taqman-Verfahren basiert auf einer reversen Transkriptionsreaktion (RT) in Kombination mit einer quantitativen PCR (qPCR) (CHEN et al., 2005).

Die RT wird dabei mithilfe von haarnadelförmigen (*stem-loop*) Oligonukleotiden, welche sequenzspezifisch an das 3'-Ende der zu untersuchenden miRNAs binden und als *Primer* für die Enzymaktivität der Reversen Transkriptase dienen, durchgeführt. Dabei sorgt die haarnadelförmige *Primer*-Struktur durch die intramolekularen Basenpaarungen für eine besonders hohe Thermostabilität und somit eine hohe Effektivität und Spezifität im Rahmen der RT. Das entstehende Produkt, welches, neben der *Primer*-Struktur, die miRNA-Sequenz sowie die revers-komplementäre Sequenz (cDNA) der miRNA enthält, wird anschließend als Matrize in die qPCR-Untersuchung eingesetzt (CHEN et al., 2005).

Bei einer quantitativen PCR wird die Amplifikation des PCR-Produktes über den Verlauf der Reaktionszyklen quantifiziert (GARIBYAN, AVASHIA, 2013; HEID et al., 1996). Im Falle des Taqman-Assays wird dazu eine fluorogene Sonde verwendet deren Fluoreszenz zunächst durch ein *Quencher*-Molekül inhibiert wird (CHEN et al., 2005; HEID et al., 1996; LIE, PETROPOULOS, 1998). Die *Annealing*-Phase der zugehörigen PCR umfasst neben der Anlagerung der *Primer* auch die sequenzspezifische Assoziation der Sonde mit der Matrize. In der folgenden Elongationsphase kommt es dann durch die 5'-Nuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase zur Hydrolyse der gebundenen Sonde und somit zur Freisetzung des Fluorophors (HEID et al., 1996; HOLLAND et al., 1991). Im Zuge der weiteren Polymerisierungsreaktion löst sich der verbleibende Teil der Sonde wieder von der Matrize (LIE, PETROPOULOS, 1998). Mit jedem PCR-Zyklus kommt es so zu einem Anstieg der Emission. Dabei wird die exponentielle Phase der PCR früher erreicht, je mehr Ausgangs-cDNA in die Reaktion eingesetzt wurde. So kann auf Grundlage des Eintritts in die exponentielle Amplifikationsphase (Threshold cycle (C_t) bzw. quantitation cycle (C_q)) und die Normierung durch die äquivalente Messung eines Haushaltsgenes ($\Delta C_q = C_q(\text{Zielgen}) - C_q(\text{Haushaltsgen})$) Rückschluss auf die (relative) Zielgen-Expression gezogen werden (CHEN et al., 2005; HEID et al., 1996; LEFEVER et al., 2009). Ein schematischer Überblick des Analyseverfahrens ist in **Abbildung 9** zusammengefasst.

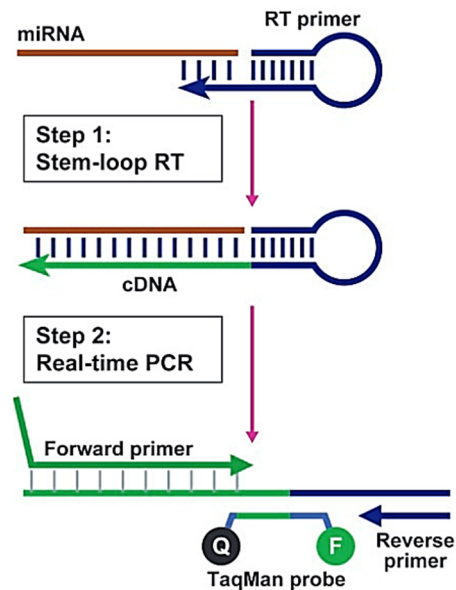


Abbildung 9: Schematischer Überblick des Taqman-Verfahrens.

Bei dem Taqman-Verfahren wird in einem ersten Schritt eine reverse Transkriptionsreaktion (RT) unter Verwendung von haarnadelförmigen (*stem-loop*) Oligonukleotid-Primern durchgeführt. Im Anschluss an die *stem-loop* RT entsteht so ein Produkt, welches die *Primer*-Struktur (blau), die miRNA-Sequenz (braun) und die revers-komplementäre Sequenz der zu untersuchenden miRNA (cDNA, grün) enthält. Im zweiten Schritt wird die Amplifikation dieses Produktes im Rahmen einer quantitativen PCR unter Echtzeitbedingungen (*real-time*) quantifiziert. Dabei wird eine sequenzspezifische, fluorogene Sonde (F) verwendet, deren Fluoreszenz zunächst durch ein gekoppeltes *Quencher*-Molekül (Q) inhibiert wird. Die Sonde assoziiert in der *Annealing*-Phase der zugehörigen PCR mit der zu quantifizierenden cDNA-Matrize. Durch die folgende Elongation kommt es zur Hydrolyse der gebundenen Sonde und somit zur Freisetzung des Fluorophors. Auf Grundlage dessen wird der Anstieg der Emission über den Verlauf der PCR-Zyklen vermessen. Der Eintritt in die exponentielle PCR-Phase erlaubt schließlich Rückschluss über die Expressionsmenge der miRNA innerhalb der Ausgangsprobe. (Quelle: (CHEN *et al.*, 2005))

Bei der experimentellen Durchführung der Taqman-RT-qPCR-Analysen wurde nach Anleitung des „TaqMan® Small RNA Assay“ Benutzerhandbuch (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) vorgegangen. Dazu wurden jeweils 5 ng der zellulären RNA in die RT-Reaktion eingesetzt und das „TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (RT) Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) verwendet. Für die Inkubation anhand des Temperaturprogrammes wurde ein „ProFlex 3x32-well PCR System“ der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) genutzt.

Von der entstandenen cDNA wurden 3 µl in die folgende qPCR-Analyse eingesetzt. Dabei wurden der „TaqMan™ Fast Advanced Master Mix“ und ein „StepOnePlus real-time PCR Instrument“ der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) genutzt. Bei der Temperaturbehandlung wurde zunächst eine thermische Aktivierung der im qPCR-Mastermix enthaltenen Uracil-N-Glycosylase (UNG) vorgenommen. Das Enzym wird häufig im Zusammenhang mit PCR basierten Methoden genutzt und ermöglicht die Reduktion von falsch-positiven qPCR-Resultaten, indem es für die Degradierung von unspezifischen Produkten und DNA-Kontaminationen in der zu analysierenden Probe sorgt (KLEIBOEKER, 2005; LONGO et al., 1990; TETZNER, 2009).

Bei der Bestimmung des C_q -Wertes wurde ein Signal-Schwellenwert von 0,2 gesetzt. Die Normierung wurde anhand einer entsprechenden Messung des Haushaltsgens *RNU48* (TaqMan™ microRNA control assay, assay ID: 001006; Thermo Fisher Scientific) vorgenommen.

Zur Validierung der Microarray-Analyseergebnisse (Spender 1, 2) wurden Taqman RT-qPCR-Untersuchungen für acht unterschiedliche miRNAs durchgeführt (hsa-let-7b-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-155-5p und hsa-miR-223-3p). Die Taqman-Analyse-Ergebnisse der Spender (3-6) wurden mit den Resultaten entsprechender Referenzproben des Spenders 2 verglichen. Zur statistischen Analyse wurden die entsprechenden ΔC_q -Werte zwischen dem maximalen und minimalen Expressionswert verglichen. Zudem wurde ein Vergleich zum Expressionswert der inaktiven Zellkontrolle vorgenommen. Dazu wurde ein gepaarte t-Testung unter der Annahme einer Normalverteilung der Daten mithilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism 7 (Graphpad Software, Inc.) durchgeführt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

Für die Validierung der quantitativen Expressionsanalysen (Kapitel 3.6.6. Verfahren zur miRNA-Quantifizierung auf Grundlage der Microarray-Daten) wurden vergleichende Taqman-Messungen der miRNAs, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-155-5p und hsa-miR-221-3p, durchgeführt. Zur Erstellung von relativen Eichkurven wurden analog zur Microarray-Eichung Proben aus miRNA-Oligonukleotid *spike-ins* (0 nmol, 50 nmol, 500 nmol and 1.000 nmol) und 75 ng einer T-zellulären Hintergrund-RNA (RIN: 9,8) generiert. Aliquots dieser Proben wurden für die miRNA-spezifischen RT-Reaktionen verwendet und die resultierenden cDNAs anschließend in die qPCR-Analyse eingesetzt. Die Hintergrund-RNA entstammte einem Aliquot der kryokonservierten, inaktiven (0 h) CD4+ T-Zellen von Spender 1. Nach Ermittlung der ΔC_q -Werte, wurden die Änderungen durch die hinzugefügten Oligonukleotid *spike-ins* durch Subtraktion der jeweiligen Messergebnisse der Hintergrund-RNA, ohne die entsprechenden Oligonukleotid *spike-ins* (0 nmol), bestimmt ($\Delta\Delta C_q$). Die Eichkurven wurden durch Auftragung des $-\Delta\Delta C_q$ -Wertes (Abszisse) gegen die Menge der Oligonukleotid *spike-ins* (Ordinate) bestimmt und auf entsprechende Messergebnisse der Zeitverlaufproben angewendet. Dabei wurden die $\Delta\Delta C_q$ -Werte relativ zu den ΔC_q -Werten der inaktiven CD4+ T-Zellen (0 h) bestimmt und die $-\Delta\Delta C_q$ -Werte für die Quantifizierung der Expressionsänderungen verwendet. Die molekularen Änderungen pro Zelle wurden berechnet, wie bereits für die Microarray basierte Quantifizierung beschrieben. Die Taqman-Analysen der Zeitverlaufproben wurden auf Grundlage von einem der drei Proben-Replikate pro Zeitpunkt durchgeführt. Dabei wurde für jede miRNA die gleiche Zeitverlaufprobe verwendet. Aufgrund der geringen Menge der verbliebenen zellulären RNA-Proben mussten bei den Analysen teilweise einzelne Zeitpunkte ausgelassen werden. Die cDNAs wurden dreimal vermessen und der resultierende Mittelwert für die relative Quantifizierung verwendet.

3.7. Auswertung und bioinformatische Analyse der Microarray-Daten

3.7.1. Bioinformatische Prozessierung der Microarray-Rohdaten

Unter Verwendung der Programmiersprache „R“ (Entwickler: R Core Team) und mithilfe des „limma R-package“ (RITCHIE et al., 2015) wurden die Microarray-Rohdaten bezüglich des Hintergrundrauschens korrigiert (method = normexp, offset = 16). Dazu wurden die Signalwerte von Kontrollsoden herangezogen, die in das Microarray-Chipsystem integriert sind (LOPEZ-ROMERO et al., 2010). Die Daten wurden mittels Quantil-Normalisierung normiert und zur besseren Vergleichbarkeit mittels \log_2 -Transformierung skaliert. Die bioinformatische Prozessierung der Microarray-Rohdaten wurde in Kooperation mit dem Zentrum für Bioinformatik (Arbeitsgruppe Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hans-Peter Lenhof; Universität des Saarlandes, Standort Saarbrücken) freundlicher Weise von Herrn Tim Kehl vorgenommen. Die prozessierten Microarray-Daten wurden (im Zusammenhang mit einer Publikation der Ergebnisse (DIENER et al., 2020)) auf der „Gene Expression Omnibus“ (GEO) Plattform hinterlegt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; Zugriffsnummer der mRNA-Daten: GSE136625; Zugriffsnummer der miRNA-Daten: GSE136626). Die korrigierten Rohsignalwerte und die normierten \log_2 -Expressionsdaten wurden mir für die Darstellung und weitere Auswertung der zeitaufgelösten miRNA- bzw. mRNA-Expressionsprofile zur Verfügung gestellt.

3.7.2. Auswertungen zur Ermittlung von miRNA-Kandidaten mit deutlicher Expressionsveränderung im Kontext des Aktivierungsprozesses

Zur statistischen Bewertung der detektierten miRNA-Expressionveränderungen, wurden für jede miRNA zunächst die Zeitpunkte der maximalen und minimalen \log_2 -Expression auf Grundlage der Median-Werte der Microarray-Ergebnisse bestimmt. Unter Annahme einer Normalverteilung der Daten, wurde anschließend ein gepaarter t-Test zum Vergleich der betreffenden Zeitpunkte durchgeführt. Für jeden Spender wurden dazu die Expressionsdaten der drei separat aktivierten Proben pro Zeitpunkt verglichen. Aufgrund der multiplen Testung wurden die resultierenden p-Werte nach der Methodik von Benjamini und Hochberg adjustiert (BENJAMINI, HOCHBERG, 1995). Ein adjustierter p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

Zur Bestimmung der am stärksten veränderten miRNAs wurden die signifikant veränderten miRNAs in einem weiteren Schritt auf Grundlage der zugehörigen Änderung zwischen der maximalen und minimalen Expression gefiltert. Ein FC von 1,5 bei gleichzeitiger statistischer Signifikanz gilt in der Regel als zuverlässiger Schwellenwert für die Detektion von zellulären miRNA-Expressionsveränderungen (DANIELS et al., 2014; MCCARTHY, SMYTH, 2009). Die *fold changes* (FCs) wurden auf Grundlage der Median- \log_2 -Expressionswerte berechnet und die miRNAs mit einem FC von mehr als 1,5 ($FC \geq 1,5$) für jeden Spender bestimmt:

$$(FC = 2^{(\text{Median-}\log_2\text{-Expression (Maximum) - Median-}\log_2\text{-Expression (Minimum))})}$$

Die Auswertungen zur Ermittlung der miRNA-Kandidaten wurden in Kooperation mit dem Zentrum für Bioinformatik (Arbeitsgruppe Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hans-Peter Lenhof; Universität des Saarlandes, Standort Saarbrücken) durchgeführt. Für die bioinformatischen Berechnungen durch Herrn Tim Kehl wurde die Programmiersprache „R“ verwendet. Die Zeitpunkte der maximalen und minimalen Expression, die zugehörigen \log_2 -Expressionswerte (Median), FCs und die adjustierten p-Werte wurden mir freundlicher Weise als Liste für alle detektierten miRNAs zur Verfügung gestellt und anschließend nach den oben beschriebenen Kriterien gefiltert.

3.7.3. Klassifikation von zeitaufgelösten miRNA-Expressionsprofilen

Zur Klassifikation der zeitaufgelösten Expressionsprofile von ausgewählten miRNAs wurden die Median-Ergebnisse der Microarray-Zeitverlaufsanalysen ($n = 6$ pro Zeitpunkt) einer zweistufigen *Cluster*-Analyse unterzogen.

Als Maß für den Vergleich zwischen zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten wurde der Euklidische Abstand verwendet (GERSTNER et al., 2020). In einem ersten Schritt wurden ähnliche Muster mithilfe einer graphisch basierten Methodik mit ganzzahliger linearer Programmierung (*Integer linear program*, ILP) nach Grötschel und Wakabayashi bestimmt (GRÖTSCHHEL, WAKABAYASHI, 1989). Dabei wurden initiale *Cluster* als Knotenpunkte innerhalb des resultierenden Cliques-Graphs bei einem Ähnlichkeits-Grenzwert von 0,895 bestimmt. Anschließend wurde die Untersuchung durch eine hierarchische *Cluster*-Analyse nach dem Ward-Verfahren ergänzt (WARD, 1963), um so die finalen Profil-Klassen, bestehend aus miRNAs mit gemeinsamen zeitaufgelösten Expressionsmustern, zu definieren.

Die bioinformatischen *Cluster*-Analysen wurden in Kooperation mit dem Zentrum für Bioinformatik (Arbeitsgruppe Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hans-Peter Lenhof; Universität des Saarlandes, Standort Saarbrücken) von Herrn Tim Kehl und Frau Kerstin Lenhof durchgeführt. Die Ergebnisse der Auswertungen wurden mir freundlicher Weise als graphische Übersicht (*Heatmap*) zur Verfügung gestellt und von mir als Abbildung der \log_2 -Zeitverlaufslinien dargestellt.

Im Zusammenhang mit einer Publikation der Ergebnisse (DIENER et al., 2020) wurden der Quelltext (*Source Code* als Programmibliothek für die Programmiersprache C++) sowie die Auswertung der miRNA-*Cluster*-Analysen durch Herrn Kehl unter dem Link <https://github.com/unisb-bioinf> (GitHub, Inc. netzbasierter Dienst; Microsoft Corporation) hinterlegt.

3.7.4. Funktionelle Analyse von Signalwegen der T-Zell-Aktivierung

Die statistische Analyse von signifikant veränderten T-Zell-Aktivierungssignalwegen wurde mithilfe des „GeneTrail 2.0“ Webservice-Tools durchgeführt (STOCKEL et al., 2016). Durch die Bestimmung der Differenz zwischen den Zeitpunkten nach der T-Zell-Aktivierung (2 h-24 h) und dem 0 h Zeitpunkt wurden für jeden Spender die Expressionsveränderungen (\log_2 -FCs) der repräsentierten mRNAs auf Grundlage der Median- \log_2 -Expressionswerte ermittelt. Die zugehörigen Gene wurden anhand des Umfangs dieser Änderungen sortiert. Im nächsten Schritt wurde eine *unweighted Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) der sortierten Gen-Liste mit einer Einordnung in verschiedene Signalwegs-Kategorien vorgenommen (BACKES et al., 2007; KELLER et al., 2007; THE GENE ONTOLOGY, 2019). Aufgrund der multiplen Testung wurden die p-Werte nach der Methodik von Benjamini und Hochberg adjustiert (BENJAMINI, HOCHBERG, 1995). Ein angepasster p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

Die beschriebenen Signalwegs-Analysen wurden in Kooperation mit dem Zentrum für Bioinformatik (Arbeitsgruppe Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hans-Peter Lenhof, Universität des Saarlandes, Standort Saarbrücken) freundlicher Weise von Herrn Tim Kehl vorgenommen. Die Ergebnisse der adjustierten p-Werte wurden mir zur Verfügung gestellt und wurden als Darstellung für verschiedene Termini der Kategorie „Gene Ontology (GO): Biological Process“ gezeigt.

3.8. Methoden auf Grundlage bioinformatischer Tools

3.8.1. Analyse von miRNA-Zielgen-Netzwerken

Die Analyse von miRNA-Zielgen-Netzwerken wurde mithilfe des „miRTargetLink“ Webservice-Tools durchgeführt (HAMBERG et al., 2016). Dazu wurde die „Search by microRNA“ Funktion und ein nachhaltiger Hinweis Typus („strong evidence type“) für bereits experimentell validierte Zielgen-Interaktionen ausgewählt. Die zugehörigen Funktionen der miRNA-Zielgene wurden durch eine Einsortierung (Over-representation analysis, FDR adjustment (BENJAMINI, YEKUTIELI, 2001)) in die Kategorie „Gene Ontology (GO): Biological Process“ mithilfe des „GeneTrail 2.0“ Webservice-Tools ermittelt (BACKES et al., 2007). Nach einer Sortierung nach Anzahl der Treffer (*Hits*) wurden die Top 5 Ergebnisse der entsprechenden GO Termini für die entsprechenden miRNA-Paarungen bestimmt.

3.8.2. Vorhersage von miRNA-Zielgenen

Für die Vorhersage von möglichen Bindestellen in den 3'UTRs von potenziellen miRNA-Zielgenen wurde das „miRWalk 2.0“ *in silico Tool* verwendet (DWEEP, GRETZ, 2015). Dabei wurden alle verfügbaren Datenbanken sowie ein minimaler Umfang der *seed*-Bindung von 6 nt ausgewählt. Im Anschluss wurden die Ergebnisse nach einer Vorhersage durch mindestens fünf der insgesamt zwölf integrierten Datenbanken (miRWalk, MicroT4, miRanda, miRBridge, miRDB, miRMap, miRNAMap, PICTAR2, PITA, RNA22, RNAhybrid und Targetscan (DWEEP, GRETZ, 2015)) gefiltert.

Für die Auswahl im Rahmen der Hoch-Durchsatz-Testung wurden die zugehörigen Gene auf eine inverse Korrelation zwischen den zeitaufgelösten mRNA-Expressionsdaten und den entsprechenden miR-155-5p-Zeitverlaufsdaten überprüft. Dabei wurden inverse Korrelationskoeffizienten nach Pearson und bzw. oder Spearman von mindestens -0,8 vorausgesetzt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient beschreibt den linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen, unter Annahme einer Normalverteilung der Daten. Im Gegensatz dazu kann ein statistischer Zusammenhang auf Grundlage des nichtparametrischen Spearman-Korrelationskoeffizienten (Rangkorrelationskoeffizient) durch die Erstellung einer Rangliste und ohne die Voraussetzung einer Normalverteilung der Daten bestimmt werden (AKOGLU, 2018; MUKAKA, 2012).

Die Bestimmung der Korrelationskoeffizienten wurde in Kooperation mit dem Zentrum für Bioinformatik (Arbeitsgruppe Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hans-Peter Lenhof, Universität des Saarlandes, Standort Saarbrücken) freundlicher Weise durch Herrn Tim Kehl unter Verwendung der Programmiersprache „R“ (R Core Team) vorgenommen. Die resultierenden Korrelationsdaten wurden mir als Liste zur Verfügung gestellt.

Zur Testung mittels dualen Luciferase-Reportergen-Assays wurden 19 der der invers korrelierenden, potenziellen Zielgene mit unterschiedlicher zellulärer Funktion und unterschiedlichem Umfang der zugehörigen mRNA-Expressionsabnahme ausgewählt

$$(\text{Fold Decrease} = 2^{(\text{Median-log}_2\text{-Expression (0 h)} - \text{Median-log}_2\text{-Expression (Minimum des Zeitverlaufs))}).$$

Die möglichen miR-155-5p-Bindestellen innerhalb der zugehörigen 3'UTR-Sequenzen sind nachfolgend in **Tabelle 14** aufgeführt.

3. Material und Methoden

Tabelle 14: Übersicht über mögliche miR-155-5p-Bindestellen in den zugehörigen 3'UTR-Sequenzen der mittels dualen Hoch-Durchsatz Luciferase-Reporter-Gen-Assays getesteten Gene.

(Die jeweils obere der beiden Sequenzen entspricht dem 3'UTR-Sequenzbereich des potenziellen Zielgens, die untere der miRNA-155-5p-Sequenz. Die tabellarische Übersicht der potenziellen Bindestellen wurde unter Verwendung von Vorhersageinformationen des miRanda- und des TargetScan-Algorithmus zusammengestellt (AGARWAL et al., 2015; BETEL et al., 2008))

Potenzielles Zielgen	Mögliche miR-155-5p-Bindestelle(n) innerhalb der 3'UTR-Sequenz
<i>ADD3</i>	5' ...CCAUGUUUCAGUGG--GCAUUAAC... 3' 3' UUGGGGAUAGUGCUAAUCGUAUU 5'
	5' ...AAGACAAGAAUCUAUAGCAUUAG... 3' 3' UUGGGGAUAGUGCUAAUCGUAUU 5'
<i>CYP2U1</i>	5' ...UUGCACUAAUAACUCAGCAUUAA... 3' 3' UUGGGGAUAGUGCUAAUCGUAUU 5'
	5' ...AGACACAUUCCUGUUGCAUUAAAG... 3' 3' UUGGGGAUAGUGCUAAUCGUAUU 5'
<i>EZH1</i>	5' ...UAGCAGCUGCAGGCAAGCAUUAA... 3' 3' UUGGGGAUAGUGCUAAUCGUAUU 5'
	5' ...UGCUGCUAUUGAAGAAGCAUUAG... 3' 3' UUGGGGAUAGUGCUAAUCGUAUU 5'
	5' ...CUUUUGGAGCAAGUUGCAUUAAAC... 3' 3' UUGGGGAUAGUGCUAAUCGUAUU 5'
<i>IFT80</i>	5' ...CACCAAGUUCAUAGC-AGCAUUAC... 3' 3' UUGGGGAUAGUGCUAAUCGUAUU 5'
	5' ...AUAGCUGUAAGUCAGGCAUUAAA... 3' 3' UUGGGGAUAGUGCUAAUCGUAUU 5'
<i>JMY</i>	5' ...AUACACCUAAAAUGUCCGCAUUACU... 3' 3' UUGGGGAUAGUGCUAAUCGUAUU 5'

3. Material und Methoden

Potenzielles Zielgen	Mögliche miR-155-5p-Bindestelle(n) innerhalb der 3'UTR-Sequenz
<i>KDM5B</i>	5' ... CACCUUUUCAUGUACAGCAUUA... 3' <div style="text-align: center;"> </div> 3' UUGGGGAUAGUGCUGAAUCGUAAU 5'
	5' ... CAUUGCCCAUUGUAAAGCAUUA... 3' <div style="text-align: center;"> </div> 3' UUGGGGAUAGUGCUGAAUCGUAAU 5'
<i>LAT2</i>	5' ... UGUUGUCUCCUAGAAAAGCAUUAC... 3' <div style="text-align: center;"> </div> 3' UUGGGGAUAGUGCUGAAUCGUAAU 5'
	5' ... AGCUUGGCACUUUAAAGCAUUA... 3' <div style="text-align: center;"> </div> 3' UUGGGGAUAGUGCUGAAUCGUAAU 5'
<i>RASA3</i>	5' ... CAUUGGGAGGUUCAGAGCAUUAC... 3' <div style="text-align: center;"> </div> 3' UUGGGGAUAGUGCUGAAUCGUAAU 5'
	5' ... GGUUUGAUGGACAGUAGCAUUAG... 3' <div style="text-align: center;"> </div> 3' UUGGGGAUAGUGCUGAAUCGUAAU 5'
<i>S100B</i>	5' ... AACAAAGCCUUAUCCAGCAUUU... 3' <div style="text-align: center;"> </div> 3' UUGGGGAUAGUGCUGAAUCGUAAU 5'
	5' ... ACUUGACACAGUGUUGCAUUAAU... 3' <div style="text-align: center;"> </div> 3' UUGGGGAUAGUGCUGAAU-CGUAAU 5'
<i>SH3BP4</i>	5' ... GCAGAGUGAAGUCCCAGCAUUAGC... 3' <div style="text-align: center;"> </div> 3' UUGGGGAUAGUGCUGAAUCGUAAU 5'
	5' ... GUAAUAAAAGCCAGUGCAUUAAAG... 3' <div style="text-align: center;"> </div> 3' UUGGGGAUAGUGCUGAAUCGUAAU 5'
<i>STARD8</i>	5' ... CCCUCAAAUCAUUA-AGCAUUAC... 3' <div style="text-align: center;"> </div> 3' UUGGGGAUAGUGCUGAAUCGUAAU 5'
	5' ... UAGGGUAAAAUUUCAGCAUUAA... 3' <div style="text-align: center;"> </div> 3' UUGGGGAUAGUGCUGAAUCGUAAU 5'

3. Material und Methoden

Potenzielles Zielgen	Mögliche miR-155-5p-Bindestelle(n) innerhalb der 3'UTR-Sequenz
<i>TAF7</i>	<pre> 5' ...GUCUUCAGACUGGUCAGCAUUAG... 3' 3' UUGGGGAUAGUGCUAAUCGUAUU 5' </pre>
<i>ZFP36</i>	<pre> 5' ...CCCCUUUCCAGAAUGCAUUAAC... 3' 3' UUGGGGAUAGUGCUAAUCGUAUU 5' </pre>

Für die Analyse von kooperativen miRNA-Zielgenen wurden mögliche 3'UTR-Bindestellen der miR-155-5p und der miR-21-5p, wie bereits oben beschrieben, mithilfe von „miRWalk 2.0“ vorhergesagt (DWEED, GRETZ, 2015). Anschließend wurde die Schnittmenge der gemeinsam vorhergesagten Zielgene bestimmt. Da vermutet wird, dass eine geringe Distanz von 8-40 nt zwischen Bindestellen eine entscheidende Voraussetzung für die kooperative Funktionsweise von miRNA-Bindestellen ist (GRIMSON et al., 2007), wurden für die exemplarische Testung mittels dualen Luciferase-Assays zwei potenzielle Zielgene anhand nahegelegener Bindestellen, einer möglichen Rolle für die T-Zell-Funktion und einer Abnahme der mRNA über den Zeitverlauf ausgewählt. Die vorhergesagten miR-155-5p und miR-21-5p Bindestellen der so ausgewählten Gene sind in **Tabelle 15** zusammengefasst.

3. Material und Methoden

Tabelle 15: Übersicht über mögliche miR-155-5p- bzw. miR-21-5p-Bindestellen in den zugehörigen 3'UTR-Sequenzen der mittels dualen Luciferase-Reportergen-Assays getesteten potenziellen Zielgene.

(Die jeweils obere der Sequenzen entspricht dem 3'UTR-Sequenzbereich des potenziellen Zielgens, die untere Sequenz der jeweiligen miRNA. Die tabellarische Übersicht der potenziellen Bindestellen wurde unter Verwendung von Vorhersageinformationen des miRanda- und des TargetScan-Algorithmus zusammengestellt (AGARWAL et al., 2015; BETEL et al., 2008)).

Potenzielles Zielgen	Mögliche miR-155-5p- bzw. miR-21-5p-Bindestelle(n) innerhalb der 3'UTR-Sequenz	
<i>IL1RAP</i>	5' ...UGAGAGUUGCUUUUGGCAUUAUU... 3' 3' UUGGGGAUAGUGC AAAUCGUAUU 5'	
	5' ...GUAGCCAGCCAUCGGGCAUUAUU... 3' 3' UUGGGGAUAGUGC AAAUCGUAUU 5'	
	<i>(miR-155-5p)</i>	
	5' ...GACACAUUUAGAAACUAAGCUAU... 3' 3' AGUUGUAGUCAGACUAUUCGAU 5'	
	5' ...AAGAACUUAUCCAGAU AAGCUU... 3' 3' AGUUGUAGUCAGACUAUUCGAU 5'	
	<i>(miR-21-5p)</i>	
<i>LEMD3</i>	5' ...UUUAUGAGGAUGUCUGCAUUAUU... 3' 3' UUGGGGAUAGUGC AAAUCGUAUU 5'	
	<i>(miR-155-5p)</i>	
	5' ...CAUUAAGCAGUAAAAUAAGCUU... 3' 3' AGUUGUAGUCAGACUAUUCGAU 5'	
<i>(miR-21-5p)</i>		

3.8.3. Ermittlung von zellulären Funktionen der identifizierten miRNA-Zielgene

Zur Analyse der zellulären Funktion von miR-155-5p-Zielgenen wurde mithilfe des „Genetrail 3.0“ Webservice-Tools eine funktionelle Einsortierung („Over-representation analysis“, FDR adjustiert (BENJAMINI, YEKUTIELI, 2001)) anhand der Kategorie “Gene Ontology (GO): Molecular Function” vorgenommen (GERSTNER et al., 2020). Ergänzend wurde eine Literaturrecherche durchgeführt.

4. Ergebnisse

Zentrale Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit wurden bereits im Rahmen einer Publikation („Quantitative and time-resolved miRNA pattern of early human T cell activation“) in der naturwissenschaftlichen Fachzeitschrift „Nucleic Acids Research“ veröffentlicht (DIENER et al., 2020).

4.1. Methodische Vorgehensweise zur Erfassung der zeitaufgelösten RNA-Expressionsprofile

Die methodische Vorgehensweise zur Ermittlung der zeitaufgelösten miRNA- und mRNA-Expressionsdaten ist nachfolgend in **Abbildung 10** zusammengefasst. Da CD4⁺ Zellen den größten Anteil der T-Zellen im menschlichen Blut bilden (TOLLERUD et al., 1989) und durch ihren regulatorischen Einfluss von entscheidender Bedeutung für die Effektivität der Immunantwort sind (LUCKHEERAM et al., 2012), wurden die Untersuchungen an CD4⁺ T-Zellen durchgeführt. Diese wurden aus peripheren Blutproben von zwei weiblichen Spendern (Spender 1 und 2), vergleichbaren Alters (26 bzw. 23 Jahre) und ohne bekannte immunologische Vorerkrankungen, gewonnen und *in vitro* aktiviert. Mit der Entnahme von drei separat aktivierten Zellproben pro Spender und Zeitpunkt, in Intervallen von 2 h und über einen Gesamt-Zeitraum von 24 h, wurden insgesamt 78 Proben gesammelt. Anschließend wurde für jede Probe die zelluläre RNA extrahiert. Die miRNA- und mRNA-Expressionsprofile wurden mithilfe des Microarray-Verfahrens erfasst. Somit wurden zeitaufgelöste RNA-Expressionsdaten zu insgesamt sechs Zeitverläufen (0-24 h) der initialen T-Zell-Aktivierungsphase ermittelt.

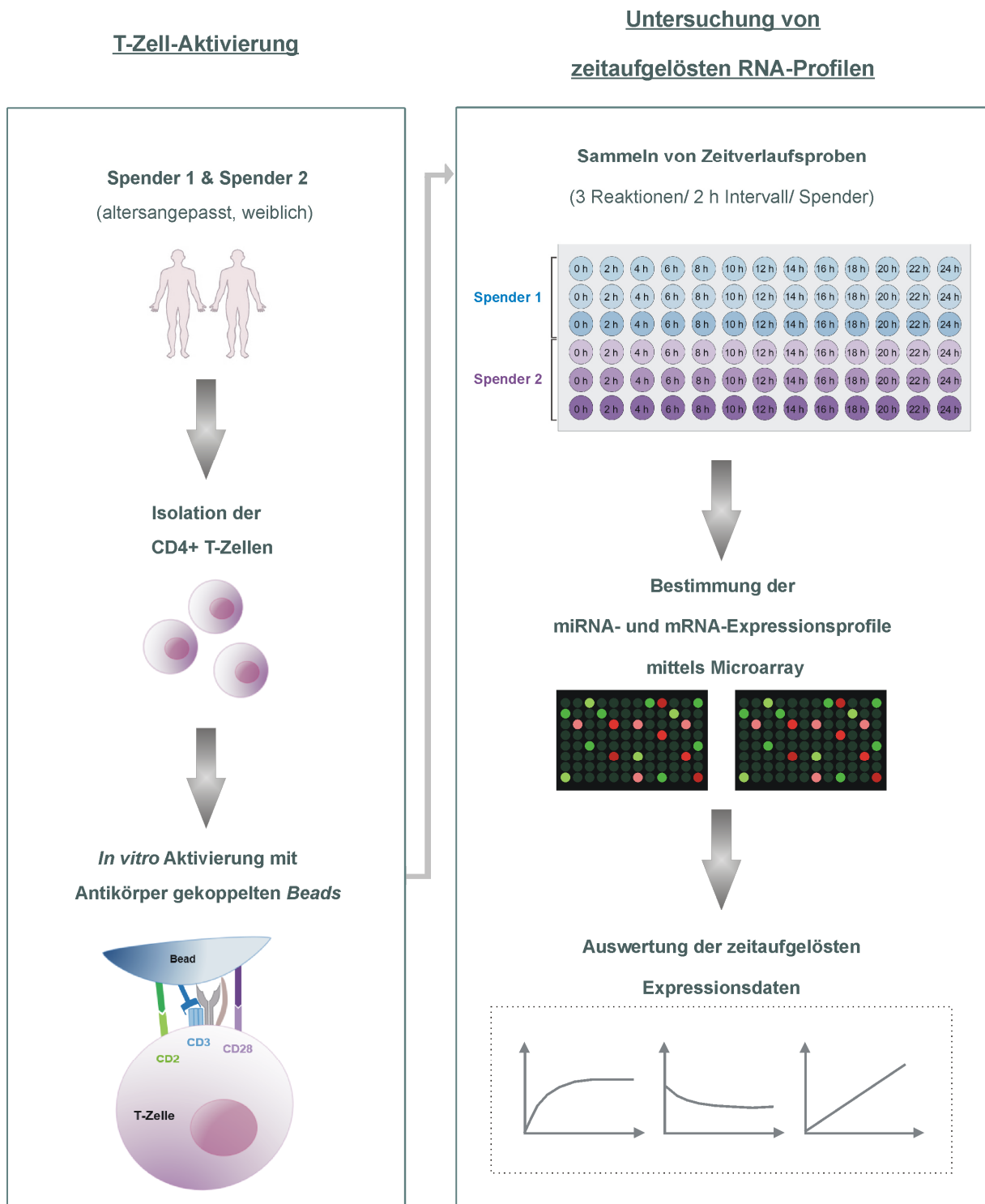


Abbildung 10: Methodische Übersicht zur Erfassung der zeitaufgelösten miRNA- und mRNA-Expressionsdaten im Zusammenhang mit den ersten 24 h der humanen T-Zell-Aktivierung.

Zunächst wurden CD4+-T-Zellen aus venösen Blutproben von zwei Spendern, gleichen Geschlechts und vergleichbaren Alters, isoliert. Anschließend wurde die T-Zell-Aktivierung *in vitro* durch die Antikörper vermittelte Stimulation von Oberflächenrezeptoren induziert. Pro Spender wurden in Intervallen von 2 h jeweils drei synchron-aktivierte Zellproben aus separaten Reaktionsansätzen entnommen. Auf Grundlage der Zeitverlaufsproben wurden im Folgenden die zeitaufgelösten RNA-Expressionsprofile ermittelt. Dazu wurde die zelluläre RNA extrahiert und die miRNA- und mRNA-Expression mithilfe des Microarray-Verfahrens analysiert.

4.2. Kontroll-Analysen der zu Grunde liegenden Parameter bei der Erfassung und Auswertung der zeitaufgelösten RNA-Expressionsprofile

Im Hinblick auf die Validität der zeitaufgelösten Expressionsdaten wurden verschiedene quantitative und qualitative Grundparameter kontrolliert. Dabei wurde der aktuelle immunologische Zustand der Probanden überprüft, um den Einfluss einer akuten Infektion auf die Ergebnisse der Zeitverlaufsanalysen auszuschließen. Des Weiteren wurden die Reinheit der isolierten CD4+ T-Zellen sowie die Menge und die Integrität der extrahierten zellulären Gesamt-RNA-Proben analysiert. Mithilfe der mRNA-Zeitverlaufsdaten wurde zudem die effektive Induktion des T-Zell-Aktivierungsprozesses kontrolliert.

Zum Nachweis des gesunden immunologischen Zustands, wurde das aktuelle Blutbild der Spender 1 und 2 zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmt. Die Analyse-Daten wurden mit den Normwerten der gesunden menschlichen Blutzusammensetzung verglichen (**Tabelle 16**). Dabei lagen sowohl die Anzahl an roten Blutzellen, die Hämoglobin- und Hämatokrit-Werte sowie die Mengen an weißen Blutzellen, inklusive Lymphozyten, Monozyten, neutrophilen und basophilen Granulozyten, für beide Spender innerhalb des Normbereiches. Für den Spender 1 entsprachen sowohl der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten an den weißen Blutzellen als auch die Anzahl der Zellen pro Blutvolumen ebenfalls den Normwerten. Im Falle des Spenders 2 lag der prozentuale Gehalt an eosinophilen Granulozyten leicht unterhalb des Referenzbereiches, die absolute Zellanzahl pro Blutvolumen entsprach jedoch den Normwerten, so dass nicht von einer Eosinopenie auszugehen war (GEORGE-GAY, PARKER, 2003; KRAUSE, BOGGS, 1987).

4. Ergebnisse

Tabelle 16: Hämatogramm-Daten der Spender 1 und 2 vom Zeitpunkt der Blutentnahme.

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme wurde das Blutbild für die Spender 1 und 2 erhoben. Die resultierenden Analysedaten sind im Vergleich zum Normbereich dargestellt.

(Definition des Normbereichs der Blutzusammensetzung nach (GEORGE-GAY, PARKER, 2003; KRAUSE, BOGGS, 1987))

Bestandteil des Blutes	Spender 1	Spender 2	Normbereich
Rote Blutzellen (<i>Red blood cells</i>; RBCs)/μl	$4,84 \times 10^6$	$4,82 \times 10^6$	$4,0 - 6,2 \times 10^6$
<i>Hämoglobin [g/dl]</i>	14	14	12 - 16
<i>Hämatocrit [%]</i>	41	41	38 - 47
Weiße Blutzellen (<i>White blood cells</i>; WBCs)/μl	$8,49 \times 10^3$	$7,58 \times 10^3$	$4,5 - 11,0 \times 10^3$
<i>Lymphozyten [% der WBCs]</i>	29	26	25 - 33
<i>Monozyten [% der WBCs]</i>	6	4	3 - 7
<i>Neutrophile Granulozyten [% der WBCs]</i>	64	70	60 - 70
<i>Basophile [% der WBCs]</i>	0,7	0,3	0 - 0,75
<i>Eosinophile Granulozyten [% der WBCs] / [Zellen/μl Blut]</i>	1,5 / $0,13 \times 10^3$	0,4 / $0,03 \times 10^3$	1 - 5 / $0,02-0,65 \times 10^3$

4. Ergebnisse

Nach der Isolation wurde die Reinheit der CD4+ T-Zellen kontrolliert (**Abbildung 11A** und **B**). Dazu wurde auf Grundlage eines zellulären Aliquots eine Oberflächenfärbung des CD4-Rezeptors mit anschließender Durchflusszytometrie-Analyse durchgeführt. Abzüglich der Hintergrundfluoreszenz, die jeweils durch die Analyse einer ungefärbten Kontrollprobe ermittelt wurde, lag der hohe Anteil an CD4+-Zellen für die Zellprobe des ersten Spenders bei 95,0 % und für die Probe des zweiten Spenders bei 83,7 %.

Die Quantität und Qualität der extrahierten zellulären Gesamt-RNA-Proben wurden mittels fluorometrischer Vermessung und kapillarelektrophoretischer Auftrennung kontrolliert. Die durchschnittliche Menge der Gesamt-RNA (Gesamtheit der isolierten RNA-Spezies, inklusive ncRNAs und mRNAs) lag dabei für Spender 1 in einem Bereich zwischen 216,5 ng (2 h) und 432,0 ng (24 h) pro Probe und für Spender 2 in einem Bereich zwischen 211,0 ng (6 h) und 402,0 ng (24 h) pro Probe. Unter Annahme einer konstanten Anzahl von 350.000 T-Zellen entsprachen die resultierende Gesamt-RNA-Mengen pro T-Zelle (Spender 1: 0,62 und 1,32 pg/Zelle; Spender 2: 0,60 und 1,15 pg/Zelle) somit dem Normbereich von circa 1-2 pg/Zelle (MONACO et al., 2019; WANG et al., 2019). Zudem wiesen die Zeitverläufe der zellulären RNA-Proben für beide Spender einen Anstieg in Richtung der späteren Analysezeitpunkte auf (**Abbildung 11C**). Eine vergleichbare Zunahme der zellulären Gesamt-RNA wurde im Zusammenhang mit dem fortschreitenden Zellzyklus und der T-Zell-Aktivierung bereits in der Literatur beschrieben (DARZYNKIEWICZ et al., 1979; POULTON et al., 1988; TEAGUE et al., 1999). Anhand von RIN-Werten zwischen 8,2 und 10,0 konnte des Weiteren eine hohe Integrität für alle RNA-Proben bestätigt werden (**Abbildung 11D**).

4. Ergebnisse

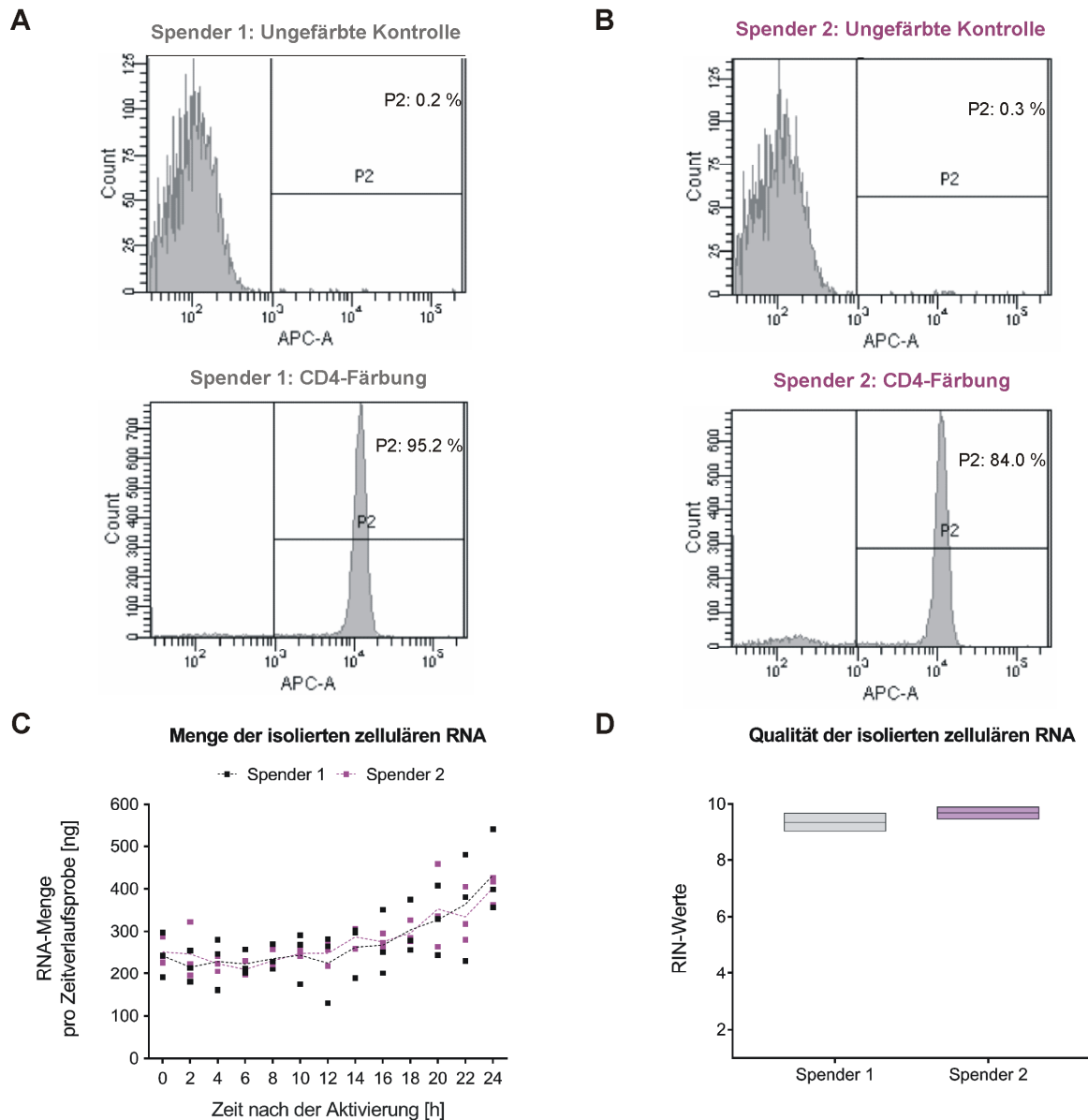


Abbildung 11: Reinheitskontrolle der isolierten CD4⁺ T-Zellen sowie quantitative und qualitative Kontrolle der extrahierten zellulären RNA-Proben.

- A, B)** Durchflusszytometrie-Analyse zur Reinheitskontrolle der isolierten CD4⁺ T-Zellen von Spender 1 (**A**) und Spender 2 (**B**). Die Ergebnisse sind als vergleichende Histogramme eines ungefärbten zellulären Aliquots und eines Aliquots, das mit einem Allophycocyanin gekoppelten, CD4-spezifischen Antikörper (APC-A-Fluoreszenz) gefärbt wurde, dargestellt. Die Zellzahl (Count) in der P2-Region entspricht dabei einer positiven CD4-Färbung.
- C)** Resultierende Quantität der zellulären RNA, nach Extraktion aus den Zeitverlaufsproben der aktivierten CD4⁺ T-Zellen. Die entsprechenden RNA-Mengen sind für jeweils drei separate Zeitverlaufsproben pro Spender (Punkte) und mit Angabe der durchschnittlichen Verlaufslinie dargestellt.
- D)** Qualitätskontrolle der zellulären RNA-Proben. Die Ergebnisse sind mit Angabe der Durchschnittswerte (Linie) und mit Angabe des Umfangs der resultierenden RIN-Werte (Box) dargestellt.

Die effektive Induktion des T-Zell-Aktivierungsprozesses wurde durch Auswertungen auf Basis der zeitaufgelösten mRNA-Expressionsdaten überprüft. Anhand einer funktionellen *Enrichment*-Analyse (STOCKEL et al., 2016) waren signifikante Expressionsveränderungen im Zusammenhang mit Signalprozessen der T-Zell-Aktivierung, der anstehenden T-Zell-Proliferation und der Effektor-Zell-Differenzierung zu verzeichnen (**Abbildung 12A**). Dabei wiesen beispielsweise der T-Zell-Rezeptor- und der NF-kappaB (*Nuclear factor kappa B/NFkB*)-Signalweg (OH, GHOSH, 2013) bereits ab dem 4 h Zeitpunkt signifikante Veränderungen im Vergleich zum Ruhezustand auf. Darüber hinaus wurde die Expressionskinetik des CD69-Rezeptors überprüft, der als Marker für die frühe Phase des T-Zell-Aktivierungsprozesses gilt (LOPEZ-CABRERA et al., 1993). Für die zugehörige mRNA war bei allen Zeitverlaufsanalysen ein vergleichbares Expressionsmuster mit einem frühen Expressionsanstieg und einer Abnahme in Richtung der späteren Untersuchungszeitpunkte erkennbar (**Abbildung 12B**). Dies entsprach anhand von vorangegangenen Studienergebnissen der mRNA-Kinetik bei einer effektiven Induktion des T-Zell-Aktivierungsprozesses (LOPEZ-CABRERA et al., 1993; WANG et al., 2008; WOLF et al., 2020).

Somit konnte insgesamt von einem gesunden immunologischen Ausgangszustand der Probanden, einer hohen Reinheit der Zielzellen, einer adäquaten Quantität und hohen Integrität der T-Zell-RNA-Proben sowie einer effektiven Induktion des T-Zell-Aktivierungsprozesses ausgegangen werden.

4. Ergebnisse

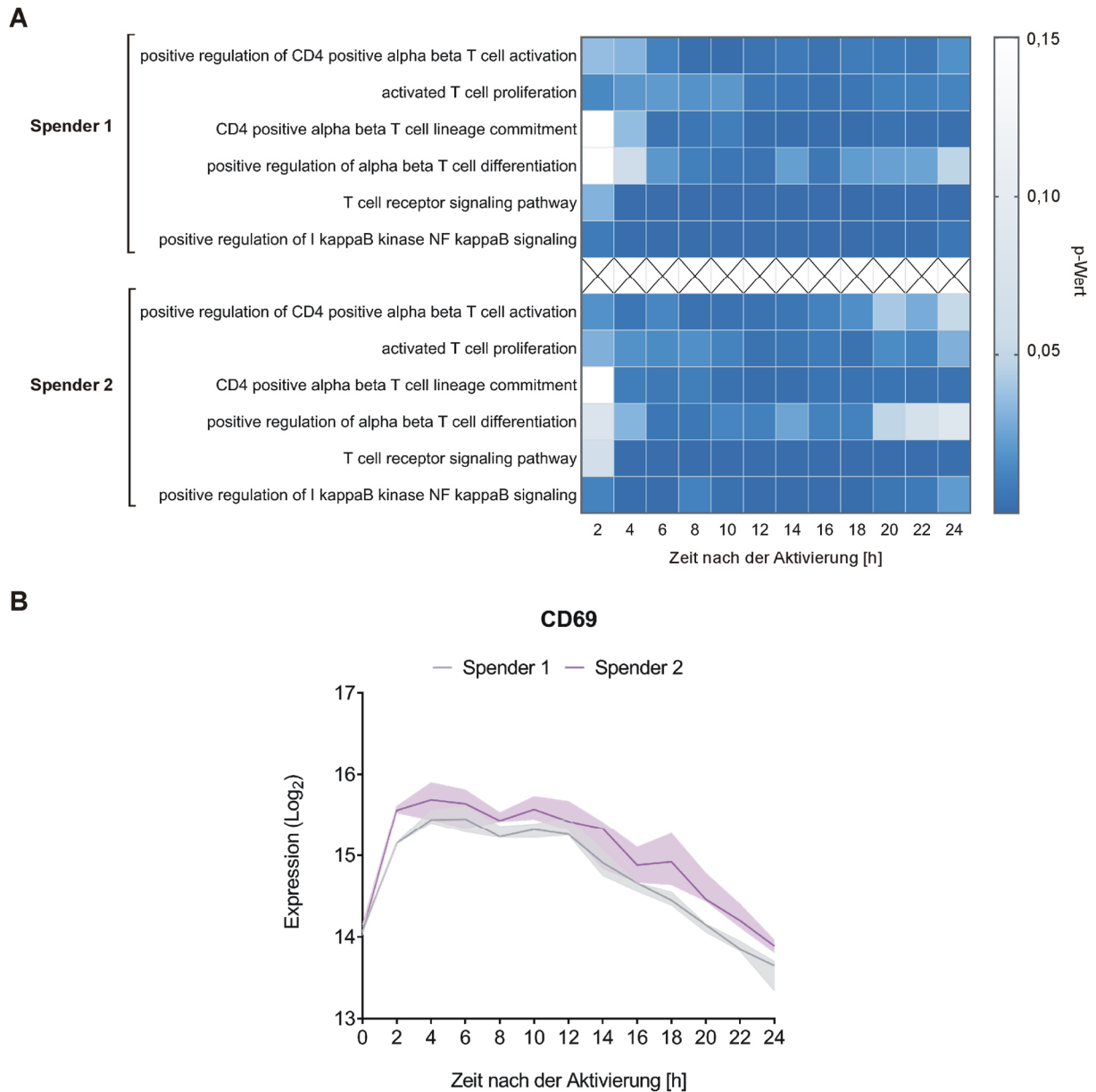


Abbildung 12: Expressionsanalysen zur Kontrolle des T-Zell-Aktivierungsprozesses.

- A)** Zum Nachweis der *in vitro* induzierten T-Zell-Aktivierung wurden funktionelle Signalwegs-Analysen auf Grundlage der mRNA-Zeitverlaufsdaten durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Expressionsveränderungen zwischen den Zeitpunkten nach dem Aktivierungsstimulus (2-24 h) und dem 0 h Zeitpunkt bestimmt. Die Ergebnisse wurden anschließend anhand des Umfangs dieser Änderungen sortiert und die entsprechenden Listen einer *unweighted Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)* unterzogen (STOCKEL et al., 2016). Dabei wurde eine Einordnung in funktionelle Signalwegs-Kategorien vorgenommen. Die resultierenden (FDR-adjustierten) p-Werte sind für beide Spender anhand repräsentativer biologischer Prozesse dargestellt (Termini der Gene Ontology (GO) Kategorie: „Biological Process“ (THE GENE ONTOLOGY, 2019)).
- B)** Zur weiteren Kontrolle des T-Zell-Aktivierungsprozesses wurde die Expression des CD69-T-Zell-Aktivierungsmarkers auf Grundlage der mRNA-Zeitverlaufsdaten überprüft. Das zugehörige Expressionsmuster ist als Median-Ergebnis (Linie) mit dem Umfangsbereich der zugehörigen \log_2 -Expressionswerte (Punkte), anhand der Analyse von jeweils drei separat aktivierten Zellproben pro Zeitpunkt und pro Spender dargestellt.

4.3. Identifizierung von miRNAs mit deutlicher und reproduzierbarer Expressionsveränderung im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses

Auf Grundlage der zeitaufgelösten Expressionsdaten sollten miRNAs identifiziert werden, welche von zentraler Bedeutung für die Regulation des initialen T-Zell-Aktivierungsprozesses sein könnten. Im Zusammenhang mit der funktionellen und transkriptionellen Umstrukturierung innerhalb der betrachteten Aktivierungsphase (HESS et al., 2004; ULLMAN et al., 1990), war von einer veränderten Expressionsdynamik der Prozess-regulierenden miRNAs auszugehen (AVRAHAM, YARDEN, 2012; GULYAEVA, KUSHLINSKIY, 2016). Folglich wurden die Stärke und die Reproduzierbarkeit der detektierten miRNA-Expressionsveränderungen als grundlegende Analyseparameter für die Identifizierung der zentralen miRNAs herangezogen. Dabei wurden biologisch und technisch reproduzierbare miRNA-Expressionsveränderungen mit statistischer Signifikanz und einem *Fold Change* (FC) von mindestens 1,5 als Voraussetzungen für eine zentrale regulatorische Funktion gewählt.

4. Ergebnisse

Insgesamt wurden im Rahmen der Expressionsanalysen 815 reife miRNAs detektiert. Durch den Vergleich zwischen den Analysezeitpunkten mit maximaler und minimaler Expression wurden für jeden Spender die miRNAs mit signifikanter Expressionsveränderung ermittelt. Die zu vergleichenden Zeitpunkte und der zugehörige FC wurden dabei für jede miRNA anhand des Median-Ergebnisses der entsprechenden \log_2 -Expressionswerte bestimmt. In den Analyseergebnissen des ersten Spenders zeigten 140 miRNAs signifikante Expressionsveränderungen. Davon wiesen 51 miRNAs Veränderungen mit einem FC von mindestens 1,5 auf. Im Falle des zweiten Spenders zeigten 231 miRNAs signifikante Expressionsveränderungen. Davon wiesen 66 miRNAs Veränderungen mit einem FC von mindestens 1,5 auf. Die Schnittmenge zwischen beiden Spendern beinhaltete insgesamt 39 gemeinsame miRNAs, die innerhalb des betrachteten Zeitraumes der T-Zell-Aktivierung Expressionsänderungen mit statistischer Signifikanz und einem FC von mindestens 1,5 aufwiesen (vergleiche **Abbildung 13** und Anhang, **Tabelle A 1**).

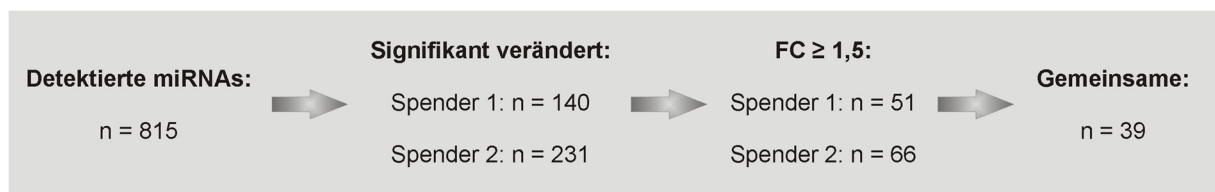


Abbildung 13: Identifizierung von zentralen miRNAs mit deutlicher Expressionsveränderung im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses.

Zur Identifizierung von zentralen miRNAs, die als dynamische Regulatoren im Zusammenhang mit der initialen T-Zell-Aktivierungsphase stehen könnten, wurde auf Basis der zellulären Zeitverlaufsdaten von beiden Spendern (1 und 2) die gemeinsame Schnittmenge der miRNAs mit signifikanter Expressionsveränderung und einem FC von mindestens 1,5 bestimmt.

Im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit konnte, neben der Signifikanz und des vergleichbaren Umfangs der Veränderungen, auch für die zeitlichen Verlaufsmuster der identifizierten miRNAs (n=39) eine hohe Ähnlichkeit festgestellt werden (exemplarisch veranschaulicht in **Abbildung 14**).

4. Ergebnisse

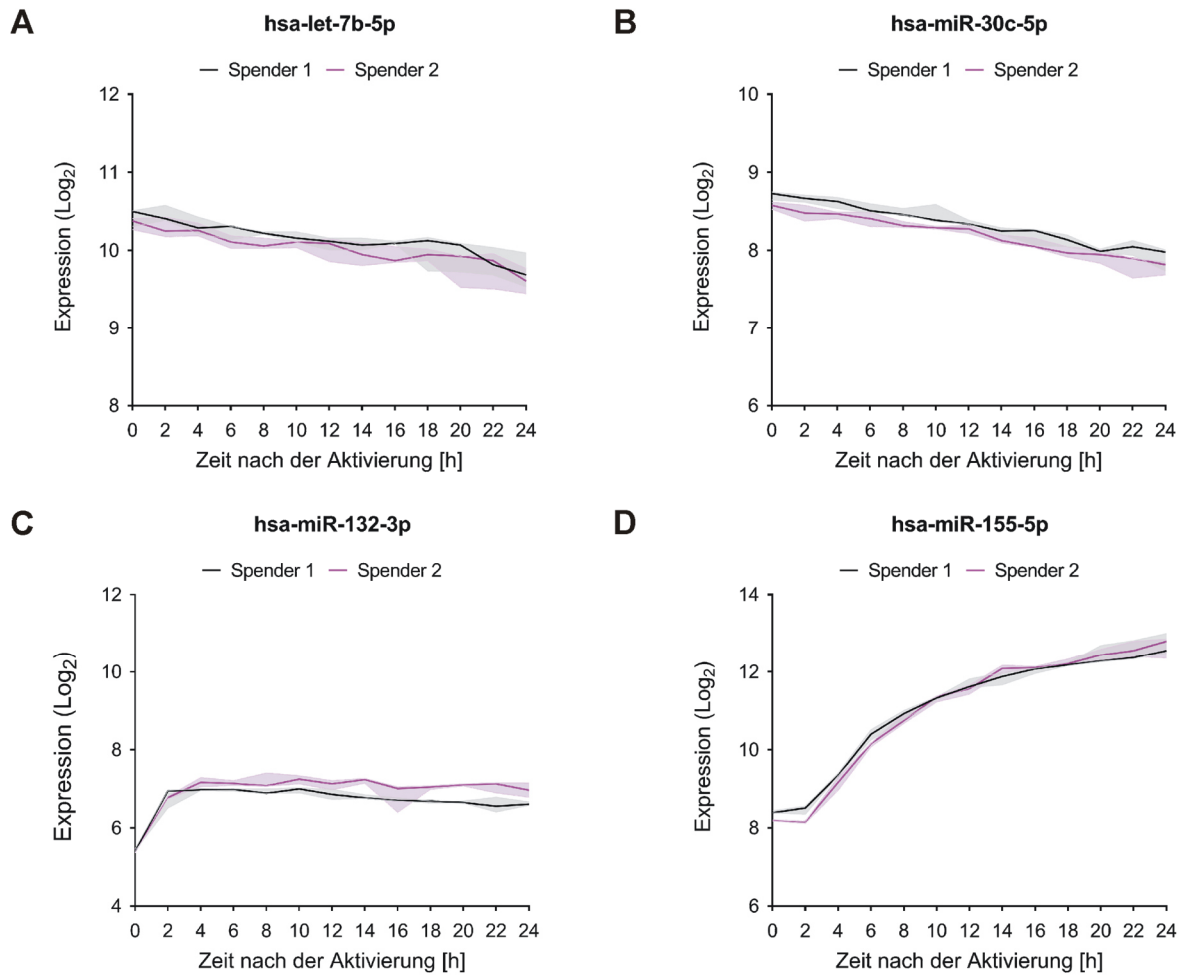


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung zur Veranschaulichung der Ähnlichkeit zwischen den zeitaufgelösten miRNA-Expressionsmustern.

Die Expressionsdaten der hsa-let-7b-5p und hsa-miR-30c-5p, mit abnehmender Expression (**A** und **B**) sowie der hsa-miR-132-3p und hsa-miR-155-5p, mit zunehmender Expression (**C** und **D**) verdeutlichen die Reproduzierbarkeit der zugehörigen miRNA-Zeitverlaufsmuster. Die zeitaufgelösten Expressionsverläufe sind dabei als Median-Ergebnis (Zeitverlaufslinie) mit dem Umfangsbereich der zugehörigen log₂-Expressionswerte (farblich hinterlegt) auf Grundlage der Analyse von jeweils drei separat aktivierten Zellproben pro Zeitpunkt und pro Spender dargestellt.

4. Ergebnisse

Die Vergleichbarkeit der zugehörigen zeitaufgelösten Expressionsdaten konnte zudem mittels Regressionsanalyse statistisch verifiziert werden (**Abbildung 15**). Zum Vergleich wurden die separat aktivierten Zeitverlaufspuren pro Spender zu drei kompletten Zeitverläufen zusammengefasst, die im Folgenden als technische Replikate bezeichnet sind. Für den paarweisen Abgleich zwischen den technischen Replikaten des jeweiligen Spenders betrug die Steigung der Regressionsgeraden zwischen 0,9988 und 1,0019. Das zugehörige Bestimmtheitsmaß (R^2) lag zwischen 0,9934 und 0,9978. Der Abgleich zwischen den unterschiedlichen Spendern zeigte ebenso eine hohe Korrelation für die zeitaufgelösten Expressionsdaten. Die Steigung der Regressionsgeraden auf Basis der Median-Expressionswerte der technischen Replikate betrug dabei 0,999 mit einem R^2 -Wert von 0,9921.

4. Ergebnisse

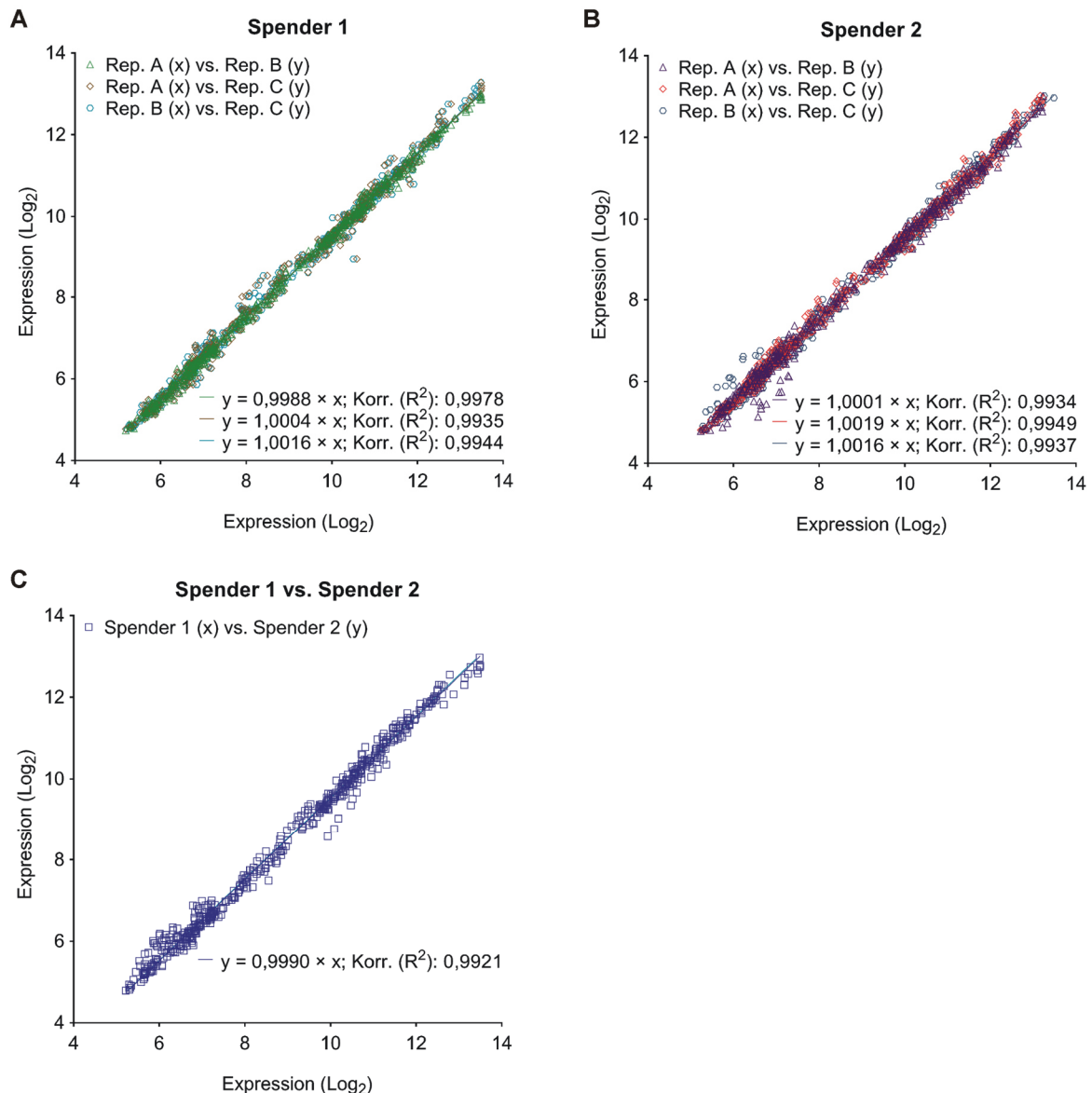


Abbildung 15: Korrelation der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten zwischen den technischen Replikaten und zwischen den unterschiedlichen Spendern.

- A, B)** Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit wurden die zeitaufgelösten Expressionsdaten der miRNAs verglichen, welche auf Grundlage von beiden Spendern signifikante und deutliche Expressionsveränderungen aufwiesen. Dazu wurden die Ergebnisse der Zeitverlaufsanalysen für jeden Spender zu jeweils drei kompletten Zeitverläufen (0-24 h) zusammengefasst, die in der Darstellung als technische Replikate (Rep.) A, B und C bezeichnet sind. Die Expressionsdaten der technischen Replikate wurden für jeden Spender (Spender 1 (**A**) und Spender 2 (**B**)) in paarweiser Gegenüberstellung korreliert. Die resultierenden Regressionslinien sind als Gesamtergebnis für den Vergleich aller miRNAs ($n=39$) und aller Analysezeitpunkte ($n=13$), mit Angabe der zugehörigen Geradengleichung sowie des Korrelationskoeffizienten (Korr.; Bestimmtheitsmaß, R^2) impliziert.
- C)** Für den Abgleich zwischen den Spendern wurden die zeitaufgelösten Expressionsdaten auf das jeweilige Median-Ergebnis der technischen Replikate reduziert. Die zugehörige Regressionslinie ist als Gesamtergebnis für den Vergleich aller miRNAs ($n=39$) und aller Analysezeitpunkte ($n=13$), mit Angabe der Geradengleichung sowie des Korrelationskoeffizienten (Korr.; Bestimmtheitsmaß, R^2) impliziert.

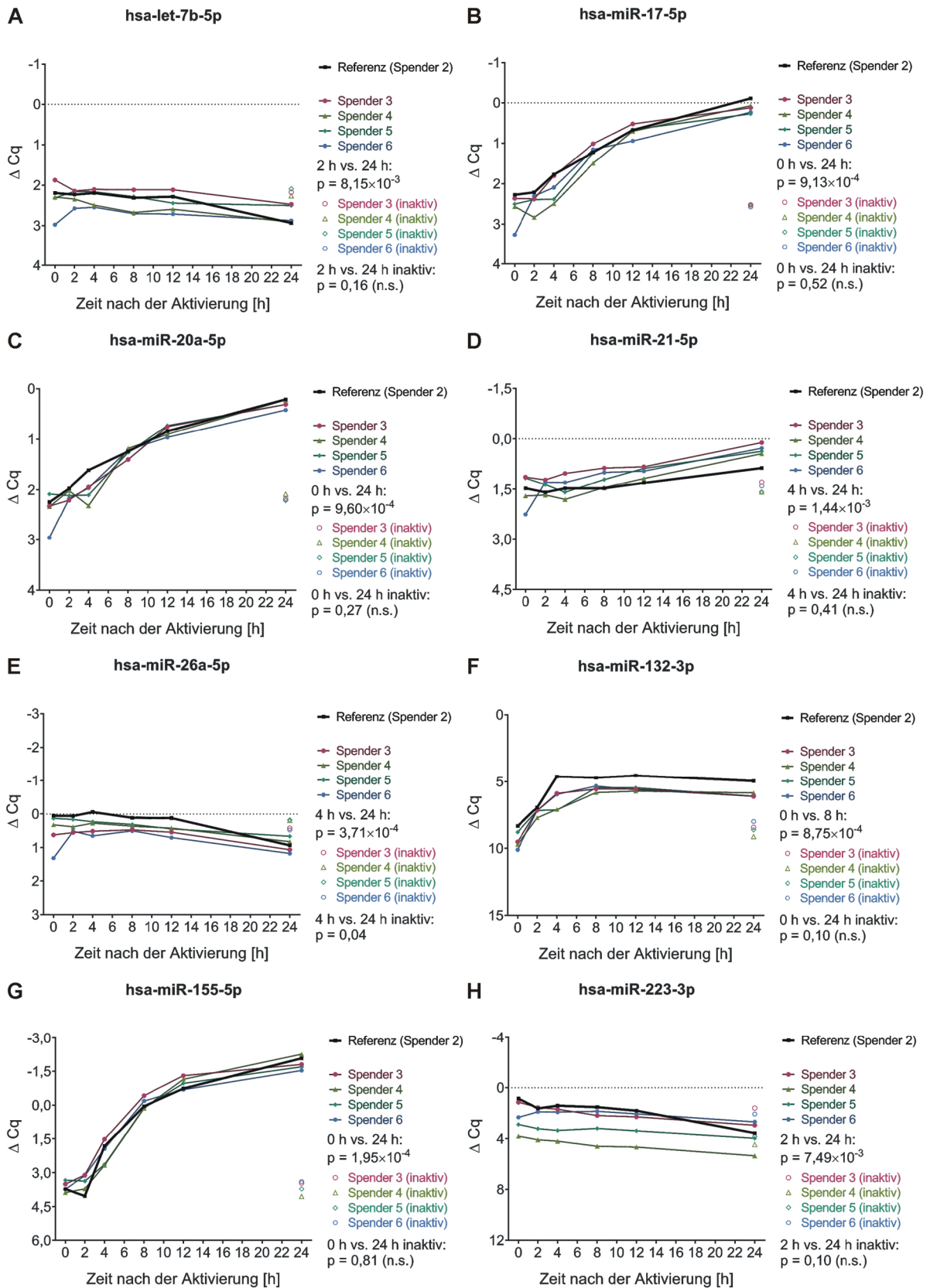
Um die Befunde zur Reproduzierbarkeit der beschriebenen miRNA-Zeitverlaufsmuster zu validieren, wurden die Zeitverlaufsexperimente mit den Zellen von vier weiteren Probanden (Spender 3-6), gleichen Geschlechts und vergleichbaren Alters, wiederholt und die miRNA-Expression durch eine unabhängige Detektionsmethodik analysiert. Da im Falle eines Spenders (Spender 6) die 0 h Probe im Rahmen der RNA-Isolation verloren ging, wurde die zugehörige RNA aus einem zellulären Aliquot extrahiert, welches nach Isolation der CD4⁺-T-Zellen im inaktiven Zustand kryokonserviert worden war. Für alle Proben konnte anhand von RIN-Werten zwischen 8,6 und 9,6 eine hohe Integrität der extrahierten zellulären RNA bestätigt werden. Die zeitaufgelösten Expressionsmuster von acht exemplarischen miRNAs der zuvor beschriebenen Gruppe (n=39) wurden anschließend spezifisch mithilfe des RT-qPCR basierten Taqman-Verfahrens analysiert. Zum Vergleich wurde eine Kontrolle des Spenders 2 für repräsentative Zeitpunkte mitgeführt. Zudem wurden entsprechende Negativkontrollen von inaktiven CD4⁺ T-Zellen nach 24-stündiger Inkubation analysiert, um den Einfluss von aktivierungs-unabhängigen Effekten auf die Änderung der miRNA-Expression auszuschließen.

Sowohl für den Bereich der ΔC_q -Expressionswerte als auch für den spezifischen Verlauf der miRNA-Expression war eine hohe Ähnlichkeit zwischen den Untersuchungsergebnissen des Referenzspenders und der erweiterten Spendergruppe erkennbar (**Abbildung 16**). Die ΔC_q -Expressionswerte auf Grundlage der Zellprobe mit Kryo-Konservierung wiesen dabei häufiger Varianzen auf, die jedoch im Zusammenhang mit dem Lagerungsprozess stehen könnten. Durch den statistischen Vergleich zwischen der maximalen und minimalen Expression konnte zudem für alle analysierten miRNAs eine signifikante Änderung während des Zeitverlaufs der T-Zell-Aktivierung bestätigt werden. Die p-Werte lagen dabei zwischen $1,95 \times 10^{-4}$ und $8,15 \times 10^{-3}$. Im Gegensatz dazu zeigten die inaktiven Kontrollen nach 24 h in der Regel keine signifikanten Veränderungen. Lediglich bei der Analyse der miR-26a-5p war eine Expressionsänderung mit Signifikanz ($p=0,04$) zu verzeichnen, die jedoch im Vergleich zur aktivierungs-gekoppelten Änderung in die entgegengesetzte Expressionsrichtung wies.

Damit konnte die stabile experimentelle und biologische Reproduzierbarkeit der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsmuster exemplarisch validiert und dabei der Einfluss durch aktivierungs-unabhängige Effekte weitestgehend ausgeschlossen werden.

Insgesamt konnten somit miRNA-Zeitverlaufsmuster (n=39 miRNAs) mit deutlicher und reproduzierbarer Expressionsveränderung nachgewiesen werden. Demnach könnte es sich bei den betreffenden miRNAs um zentrale Regulatoren des T-Zell-Aktivierungsprozesses handeln.

4. Ergebnisse



(Die zugehörige Abbildungslegende der Abbildung 16 befindet sich auf der nachfolgenden Seite)

Abbildung 16: Vergleichende Analysen zur Reproduzierbarkeit der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsmuster.

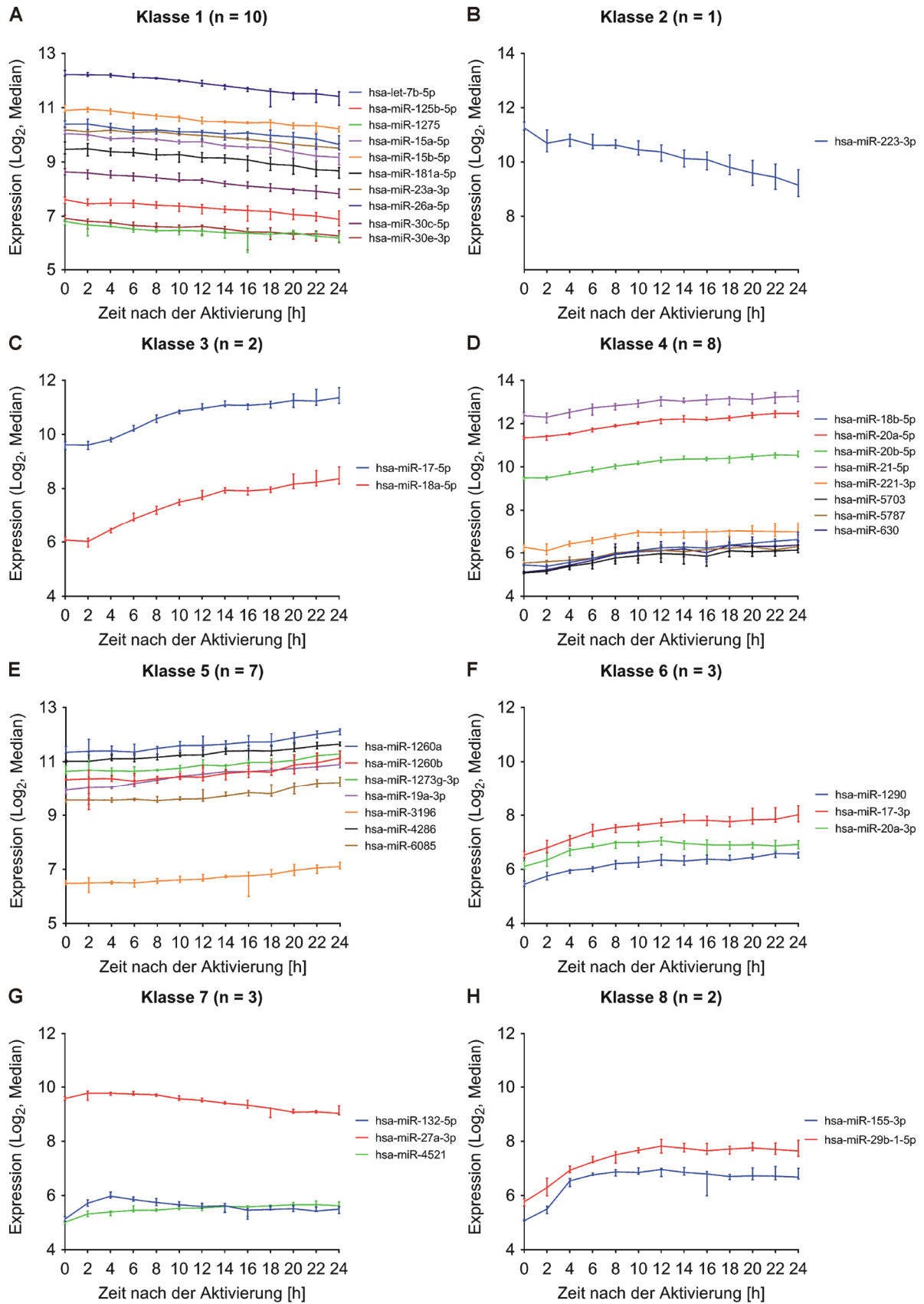
Zur Validierung der Befunde auf Grundlage der Microarray-Analysen wurden die Zeitverlaufsuntersuchungen mit Zellproben von vier weiteren Spendern (Spender 3-6) wiederholt. Die zeitaufgelösten Expressionsmuster von acht exemplarischen miRNAs (Abbildungsteile **A-H**) wurden mit dem RT-qPCR basierten Taqman-Verfahren analysiert. Zum Vergleich wurde eine Kontrolle des Spenders 2 für repräsentative Zeitpunkte mitgeführt (eins von insgesamt drei technischen Zeitverlaufsreplikaten). Die zugehörigen Zeitverläufe auf Grundlage der Spender 3-6 wurden anhand des minimalen und maximalen normierten Expressionswertes (ΔC_q) auf eine signifikante Änderung während des untersuchten Zeitraumes überprüft. Die Zeitpunkte der minimalen und maximalen Expression wurden dabei jeweils auf Grundlage des Median-Exgebnisses der Spender 3-6 ermittelt. Zudem wurden entsprechende Negativkontrollen inaktiver CD4+ T-Zellen nach 24-stündiger Inkubation analysiert. (*n.s.=Nicht signifikant*)

4.4. Klassifikation von zeitaufgelösten miRNA-Expressionsmustern im Zusammenhang mit der T-Zell-Aktivierung

Um eine genauere Beschreibung der miRNA-Expressionsdynamik im Zusammenhang mit der T-Zell-Aktivierung zu ermöglichen, wurden die zeitaufgelösten Expressionsmuster der zuvor identifizierten miRNAs ($n=39$; Kapitel 4.3. Identifizierung von miRNAs mit deutlicher und reproduzierbarer Expressionsveränderung im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses.) klassifiziert. Die zugehörigen Expressionsprofil-Klassen wurden auf Grundlage von gemeinsamen miRNA-Zeitverlaufsmustern in einem zweistufigen Analyse-Prozess, durch die Kombination einer graphisch basierten Methodik und einer hierarchischen *Cluster*-Analyse, ermittelt (GERSTNER et al., 2020; GRÖTSCHEL, WAKABAYASHI, 1989; WARD, 1963). Dabei wurden die \log_2 -Microarray-Expressionsdaten als Gesamtergebnis für beide Spender, das heißt als Median-Expressionswerte auf Basis von insgesamt sechs Proben pro Zeitpunkt, ausgewertet.

Von den resultierenden 11 Expressionsprofil-Klassen (**Abbildung 17**) enthielten die Klassen 1 und 4 die meisten miRNAs (n (Klasse 1) = 10; n (Klasse 4) = 8). Dabei zeichneten sich die Zeitverläufe durch kontinuierliche und moderate Expressionsveränderungen aus. Im Falle der gemeinsamen miRNAs der Klasse 1 entsprachen diese einer Expressionsabnahme, während die gemeinsamen miRNAs der Klasse 4 ab dem 2 h Zeitpunkt eine Expressionszunahme zeigten. Die vier kleinsten Klassen (Klassen 2, 9, 10 und 11) beinhalteten hingegen jeweils nur einzelne miRNAs mit spezifischen Expressionsmustern (miR-223-3p, miR-155-5p, miR-132-3p und miR-21-3p). Dabei war für die miR-155-5p die am stärksten ausgeprägte Expressionsveränderung (FC (Median) = 21,4) von allen analysierten miRNAs zu verzeichnen. Das zugehörige Zeitverlaufsmuster wies eine stetige starke Zunahme der miR-155-5p-Expression zwischen 2 h und 24 h auf. Der Expressionsverlauf der miR-223-3p entsprach hingegen einer kontinuierlichen Expressionsabnahme, welche im Vergleich zu den miRNAs der Klasse 1 eine etwas stärkere Ausprägung besaß.

4. Ergebnisse



(Die Abbildung wird auf der nachfolgenden Seite fortgesetzt)

4. Ergebnisse

(Fortgesetzte Abbildung)

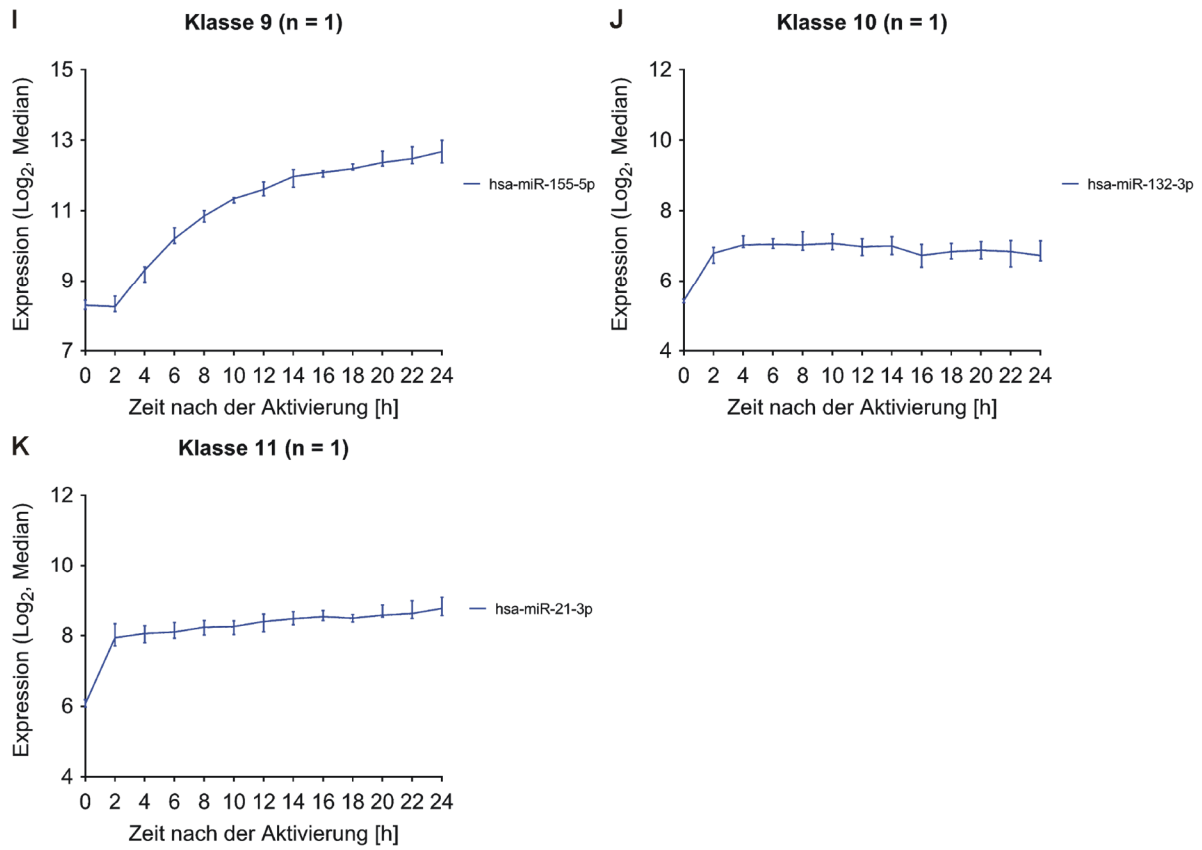


Abbildung 17: Repräsentative Expressionsprofil-Klassen, bestehend aus miRNAs mit gemeinsamen zeitaufgelösten Expressionsmustern.

Die zuvor bestimmten miRNAs mit deutlicher und reproduzierbarer Expressionsänderung in beiden Spendern (n=39) wurden mittels *Cluster*-Analyse in die 11 dargestellten Expressionsprofil-Klassen (Abbildungsteile **A-K**) eingeteilt. MiRNAs mit vergleichbaren Expressionsmustern wurden dabei zunächst mithilfe einer graphisch basierten *Cluster*-Methodik bestimmt, die anschließend durch eine hierarchische *Cluster*-Analyse ergänzt wurde. Die Zeitverläufe der jeweiligen miRNAs in den unterschiedlichen Klassen sind als Median-Expressionswerte (Linie) mit Angabe des Expressionsumfangs (Fehlerindikatoren) als Gesamtergebnis der beiden Spender, das heißt auf Basis von insgesamt sechs Proben pro Zeitpunkt, dargestellt.

Die Expressionsmuster der miR-132-3p und miR-21-3p waren durch einen frühen Expressionsanstieg mit plateauartigem Verlauf gekennzeichnet. Die Expressionstendenz in der späteren Plateau-Phase deutete im Falle der miR-132-3p auf eine leichte Reduktion hin, während der Expressionsverlauf der miR-21-3p in Richtung eines leichten Anstieges wies. Alle weiteren Expressionsprofil-Klassen zeichneten sich ebenfalls durch kontinuierliche Veränderungen oder plateauartige Expressionsverläufe aus. Unterschiede zu den bereits beschriebenen Klassen lagen beispielsweise in der Ausprägung oder im zeitlichen Beginn der Expressionsveränderungen.

Zur weiteren Aufschlüsselung der miRNA-Expressionsdynamik wurde die Verteilung der miRNAs zwischen den unterschiedlichen Profil-Klassen analysiert. Durch unterschiedliche thermodynamische Eigenschaften kommt es bei der Einlagerung in den RISC zu einer unterschiedlichen Strangpräferenz und damit zu einer unterschiedlichen biologischen Aktivität der gemeinsam prozessierten 5p- bzw. 3p-miRNA-Stränge (HU et al., 2009; KHVOROVA et al., 2003). Auf Grundlage der *Cluster*-Zuordnung wiesen reife miRNA-Einzelstränge mit vergleichbarer biologischer Aktivität häufig auch eine ähnliche Expressionsdynamik auf. So wurden beispielsweise die 3p-Stränge der miR-155 und miR-29b-1 mit geringerer biologischer Aktivität der Klasse 8 zugeordnet, während die Klasse 8 jeweils die biologisch aktiveren 5p-Stränge der miR-17 und miR-18a enthielt (KOZOMARA et al., 2019). Im Gegensatz dazu wiesen die 3p- und 5p-Stränge desselben miRNA-Vorläufers in der Regel eine unterschiedliche Expressionsdynamik auf. Dementsprechend wurden beispielsweise die 5p und 3p Stränge der miR-21 jeweils den Profil-Klasse 4 und 11 zugeordnet. MiRNAs können zudem auf Basis von Sequenzhomologien und der Struktur der pre-miRNAs in bestimmte miRNA-Familien eingeteilt werden (KACZKOWSKI et al., 2009; KOZOMARA et al., 2019). Anhand der *Cluster*-Klassifizierung zeigten miRNAs, welche den gleichen Familien zugeordnet werden, oft auch ähnliche Expressionsmuster. So wurden beispielsweise die miR-15a-5p und die miR-15b-5p der miR-15-Familie beide der Expressionsprofil-Klasse 1 zugeordnet.

4.5. Identifizierung von Zielgenen zur funktionellen Charakterisierung der miR-155-5p

Aufgrund der besonders ausgeprägten Veränderung im Zusammenhang mit der initialen T-Zell-Aktivierungsphase, wurde die Funktionalität der miR-155-5p genauer untersucht. Die regulatorische miRNA-Funktion wurde dabei durch die Identifizierung von Zielgenen spezifiziert. Dazu wurde eine *in silico* Vorhersage von potenziellen miR-155-5p-Zielgenen durchgeführt. Die Auswahl der zu testenden Gene fand unter Berücksichtigung der zeitaufgelösten miRNA- und mRNA-Expressionsdaten statt und die postulierten miRNA-Zielgen-Beziehungen wurden mithilfe von dualen Luciferase-Assays überprüft.

In silico Vorhersagen von miRNA-Zielgenen basieren vor allem auf der Suche nach 3'UTR-Sequenzmotiven, die durch eine (partielle) reverse Komplementarität zur miRNA-spezifischen *seed*-Sequenz potenzielle miRNA-Bindestellen darstellen könnten (ROJO ARIAS, BUSSKAMP, 2019; WITKOS et al., 2011). Da jedoch noch weitere Faktoren eine Rolle für die Funktionalität der miRNA-Bindestellen spielen können (KERTESZ et al., 2007; MARIN, VANICEK, 2011; SHEU-GRUTTADAURIA et al., 2019b), liegen unterschiedlichen Vorhersagemodellen häufig unterschiedliche Parameter zu Grunde (KERN et al., 2020; RIOLO et al., 2020).

Potenzielle miR-155-5p-Bindestellen in den 3'UTR-Sequenzen möglicher Zielgene wurden mithilfe des *in silico* Tools „miRWalk 2.0“ vorhergesagt, welches die Vorhersage-Informationen von 13 unterschiedlichen Datenbanken integriert (DWEED, GRETZ, 2015). Die Analyse lieferte insgesamt 42.554 Resultate, von denen 5.305 dem folgenden Filterkriterium einer stabilen Vorhersage durch mindestens fünf der integrierten Datenbanken entsprachen. 535 vorhergesagte Zielgene wiesen zudem eine inverse Korrelation zwischen den Expressionsdaten der miR-155-5p und den entsprechenden zeitaufgelösten mRNA-Expressionsdaten auf (**Abbildung 18**). Dabei wurde ein inverser Pearson- und bzw. oder nichtparametrischer Spearman-Korrelationskoeffizient von mindestens -0,8 in mindestens einem der beiden Spender vorausgesetzt.



Abbildung 18: Übersicht zur Vorhersage und Auswahl potenzieller miR-155-5p-Zielgene.

Mögliche miR-155-5p-Bindestellen in den 3'UTR-Sequenzen von mRNAs wurden mittels *in silico* Vorhersage mit dem miRWalk 2.0 Vorhersage-Tool bestimmt (DWEED, GRETZ, 2015). Die resultierende Liste wurde anschließend anhand einer Vorhersage von mindestens 5 der integrierten Datenbanken gefiltert. Im Folgenden wurden die zugehörigen Gene auf eine inverse Korrelation zwischen den zeitaufgelösten mRNA-Expressionsprofilen und dem Zeitverlauf der miR-155-5p überprüft. 19 der invers korrelierenden potenziellen Zielgene wurden anschließend mittels dualen Luciferase-Assays getestet.

19 dieser Gene (*ADD3*, *CYP2U1*, *DDX17*, *EZH1*, *HERC3*, *IFT80*, *JMY*, *KDM5B*, *LAT2*, *LDLRAP1*, *RASA3*, *RXRA*, *S100B*, *SH3BP4*, *SORL1*, *STARD8*, *TADA2B*, *TAF7* und *ZFP36*) wurden auf Grundlage des unterschiedlichen Umfangs der zugehörigen mRNA-Expressionsreduktion als mögliche miR-155-5p-Zielgene für die exemplarische Testung mittels dualen Luciferase-Assays ausgewählt. Die zugehörigen *Fold Decreases* über den Zeitverlauf betragen zwischen 1,3 und 26,3 (Anhang, **Tabelle A 2** und **Abbildung A 3**).

Zunächst wurden 3'UTR-Reporterplasmide auf Grundlage des dualen Luciferase-Reporterplasmids „pMIR-RNL-TK“ kloniert (BEITZINGER et al., 2007). Die Polylinkerregion des Plasmids liegt im 3'-Bereich eines Reportergens der Firefly-Luciferase, so dass die zugehörige mRNA unter die regulatorische Kontrolle der klonierten 3'UTR-Sequenzen gestellt werden kann. Das resultierende Luciferase-Protein kann später indirekt in einer messbaren Lichtreaktion nachgewiesen werden (DYER et al., 2000; GREER, SZALAY, 2002; STABLES et al., 1999). Zusätzlich enthält das duale Plasmid ein konstitutiv exprimiertes Reportergen der Renilla-Luciferase, deren Lichtreaktion eine Normierung der Firefly-Luciferase-Aktivität anhand der Transfektions-Effizienz ermöglicht (BEITZINGER et al., 2007). Als Resultat der dualen Luciferase-Reportergen-Assays kann so die postulierte miRNA-Zielgen-Beziehung anhand einer Reduktion der Firefly-Luciferase-Aktivität bei gleichzeitiger Überexpression der zu untersuchenden miRNA verifiziert werden (BEITZINGER et al., 2007; CHOU et al., 2018; KUHN et al., 2008).

Die pMIR-RNL-TK basierten Reporter-Konstrukte der zu untersuchenden Zielgene wurden unter Überexpression der miR-155-5p im humanen Zellsystem getestet. Wegen der Größe der Sequenz und dem Vorhandensein mehrerer vorhergesagter miRNA-Bindestellen, wurden zwei Teil-Konstrukte der *KDM5B*-3'UTR erstellt und untersucht. Für die simultanen Testung der 3'UTR-Konstrukte wurde ein semi-automatisiertes Hoch-Durchsatz-Messverfahren angewandt (KERN et al., 2021). Zur Bestimmung von 3'UTR-spezifischen Effekten wurden die Untersuchungsergebnisse der 3'UTR-Konstrukte im relativen Vergleich zu entsprechenden Analysen des leeren Reporterplasmids ausgewertet (BEITZINGER et al., 2007; CHOU et al., 2018; KUHN et al., 2008).

4. Ergebnisse

Anhand einer signifikanten Reduktion der relativen (Firefly-)Luciferase-Aktivität im Zusammenhang mit der miR-155-5p (p -Werte $1,94 \times 10^{-12}$ bis $3,15 \times 10^{-4}$), konnten insgesamt 17 von 19 getesteten Genen als Ziele der miR-155-5p bestätigt werden (**Abbildung 19** und Anhang, **Tabelle A 3A**). Dabei lag die Luciferase-Aktivität der zugehörigen 3'UTR-Konstrukte im relativen Vergleich zum leeren Reporterplasmid zwischen 45,2 % und 87,2 %. Der Standardfehler (*standard error of the mean*; SEM) betrug zwischen $\pm 1,7$ und $\pm 5,7$. Lediglich für die 3'UTR-Konstrukte der Gene *RASA3* und *RXRA* war kein signifikanter Effekt der miR-155-Überexpression zu beobachten. Die zugehörige relative Luciferase-Aktivität lag im Vergleich zum leeren Reporterplasmid bei 99,7 % (SEM: $\pm 4,2$; $p=0,94$) und bei 94,3 % (SEM: $\pm 3,8$; $p=0,17$).

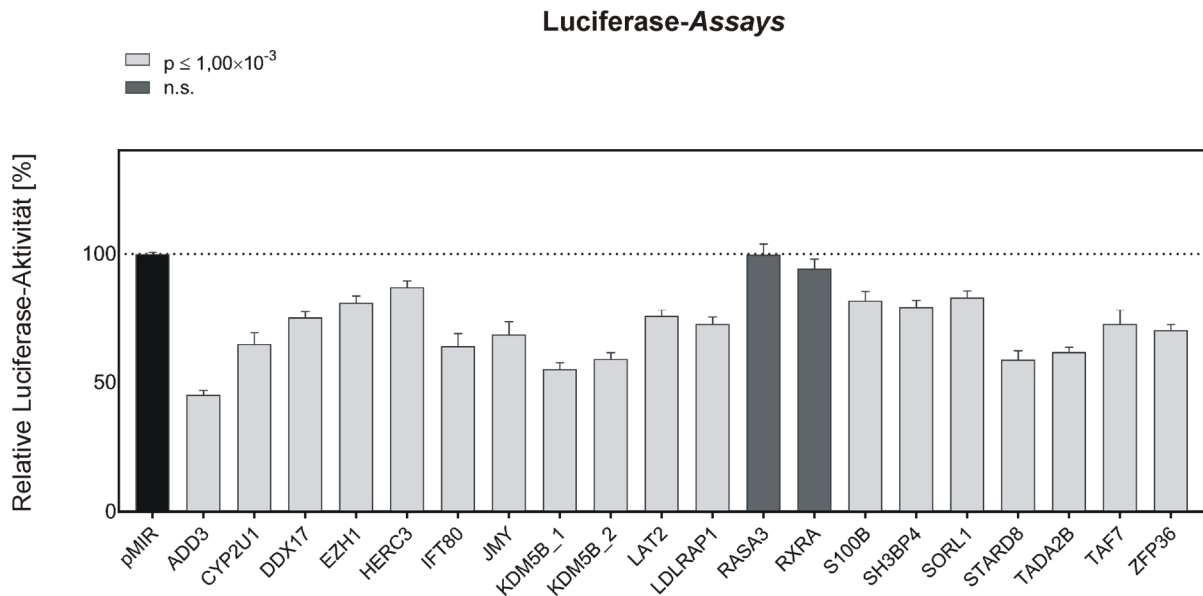


Abbildung 19: Ergebnisse der Hoch-Durchsatz Luciferase-Reportergen-Assays zur Identifizierung von Zielgenen der miR-155-5p.

3'UTR-Reporterplasmid-Konstrukte der potenziellen miR-155-5p-Zielgene wurden im humanen HEK293T-Zellsystem mittels dualen Luciferase-Reportergen-Assays und unter Überexpression der miR-155 (pSG5-miR-155) getestet. Die Vermessung der Zellextrakte fand 48 h nach der Transfektion statt. Die Aktivität der Firefly-Luciferase wurde zunächst anhand der Aktivität der Renilla-Luciferase sowie der basalen Reporter-Aktivität (Vergleichende Testung des leeren pSG5-Plasmides) normiert und die Ergebnisse der 3'UTR-Konstrukte anschließend in Relation zur Aktivität des leeren Reporterplasmids (pMIR-(RNL-TK)) gesetzt. Die relative Luciferase-Aktivität [%] des jeweiligen Zielgen-Konstruktes ist als Mittelwert und mit Angabe des Standardfehlers (SEM) auf Grundlage von vier unabhängigen Untersuchungen dargestellt, die in technischen Duplikaten durchgeführt wurden. (p =Bereich des FDR adjustierten p -Wertes im Vergleich zur leeren Reporter-Kontrolle; n.s.=Nicht signifikant)

4. Ergebnisse

Zur Validierung der Messergebnisse wurden exemplarisch für vier der positiv getesteten Zielgene (*ADD3*, *LAT2*, *S100B* und *STARD8*) 3'UTR-Reporterkonstrukte mit mutierten Sequenzen der vorhergesagten miR-155-5p-Bindestellen generiert. Anschließend wurden die dualen Luciferase-Messungen der Wildtyp-Konstrukte wiederholt und durch vergleichende Analysen der mutierten Konstrukte ergänzt (**Abbildung 20** und Anhang, **Tabelle A 3B**). Dabei konnte erneut eine signifikante Abnahme der relativen Luciferase-Aktivität im Zusammenhang mit der miR-155-Expression für alle Wildtyp-3'UTR-Konstrukte detektiert werden (p -Werte $6,61 \times 10^{-7}$ bis $8,40 \times 10^{-4}$). Die relative Luciferase-Aktivität im Vergleich zum leeren Reporterplasmid lag dabei im Bereich zwischen 46,5 % und 72,8 %. Die SEM-Werte betragen zwischen $\pm 2,1$ und $\pm 6,00$. Bei den Messungen der mutierten Konstrukte konnte hingegen keine signifikante Reduktion der Luciferase-Aktivität im Vergleich zum leeren Reporterplasmid festgestellt werden (p -Werte 0,27 bis 0,55). Die relative Luciferase-Aktivität lag im Bereich zwischen 92,0 % und 106,8 %. Die SEM-Werte betragen zwischen $\pm 3,7$ und $\pm 8,9$. Anhand der Analysen der mutierten Reporterkonstrukte konnten somit die Zusammenhänge zwischen der positiven Zielgen-Testung und der postulierten miRNA-Bindung validiert werden (KUHN et al., 2008).

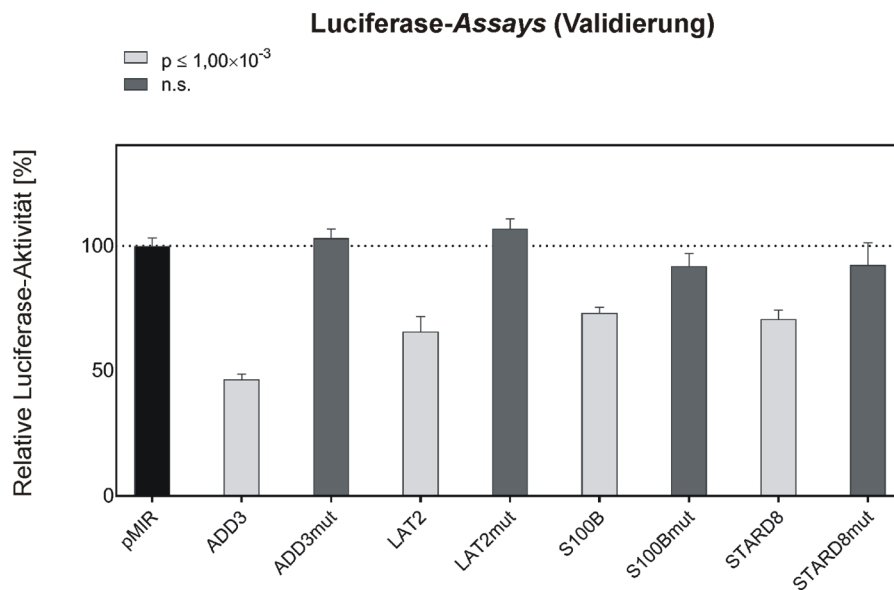


Abbildung 20: Validierung der Hoch-Durchsatz Luciferase-Reporteragen-Assays.

Zur Validierung der initialen Luciferase-Assays (Abbildung 19) wurden exemplarisch für vier der positiv getesteten Zielgene die Messungen der 3'UTR-Reporterkonstrukte wiederholt und durch die Messung von 3'UTR-Reporterkonstrukten mit mutierten miR-155-5p-Bindestellen (mut) erweitert. Es wurden drei unabhängige Untersuchungen in technischen Duplikaten durchgeführt. Die relative Luciferase-Aktivität [%] des jeweiligen Zielgen-Konstruktes ist als Mittelwert und mit Angabe des Standardfehlers (SEM) dargestellt. (p =Bereich des FDR adjustierten p -Wertes im Vergleich zur leeren Reporter-Kontrolle; n.s.=Nicht signifikant)

Um die zellulären Funktionen der identifizierten miR-155-5p-Ziele zu spezifizieren, wurde eine funktionelle Einsortierung mithilfe des „Genetrail 3.0“ Webservice-Tools durchgeführt (GERSTNER et al., 2020). Die molekulare Funktion von sechs der Gene (*DDX17*, *EZH1*, *JMY*, *KDM5B*, *TADA2B*, *TAF7*) lag dabei auf dem Gebiet der transkriptionellen Co-Regulation. Die zugehörigen Genprodukte waren mit einem signifikanten p-Wert von $6,89 \times 10^{-4}$ durch den GO Terminus “transcription coregulator activity” repräsentiert. Für vier der Gene (*DDX17*, *JMY*, *TADA2B*, *TAF7*) wurde die Funktion der Genprodukte zudem im Bezug auf die transkriptionelle Co-Aktivierung spezifiziert (GO Terminus “transcription coactivator activity”; $p = 9,52 \times 10^{-3}$) (THE GENE ONTOLOGY, 2019). Für weitere Signalprozesse waren keine signifikanten Resultate zu verzeichnen. Ergänzend wurde daher eine Recherche mithilfe der zugehörigen Fachliteratur durchgeführt. Anhand dieser lagen neben der transkriptionellen Regulation weitere zelluläre Funktionen der identifizierten miR-155-5p-Ziele in der Integration von Kalzium gesteuerten Signalwegen (*ADD3* und *S100B*), der Modulation von Immunzell-Signalen (*CYP2U1*, *IFT80* und *LAT2*), in der Regulation der Protein- und RNA-Stabilität (*HERC3* und *ZFP36*), der Regulation von Endozytose-Prozessen (*LDLRAP1*, *SH3BP4*) sowie der Organisation des intrazellulären Transportes und des Zytoskeletts (*SORL1* und *STARD8*) (**Tabelle 17**; Seite 103ff.).

4. Ergebnisse

Tabelle 17: Übersicht zur Funktion der identifizierten miR-155-5p-Zielgene.

Die aufgelisteten Gene wurden mittels dualen Luciferase-Assays als Zielgene der miR-155-5p identifiziert. Ihre zelluläre Funktion wurde anhand von Beschreibungen der zugehörigen Fachliteratur ermittelt.

Zielgen	Funktion des zugehörigen Proteins (Literaturrecherche)	Quelle
<i>ADD3</i> (<i>Adducin 3</i>)	Membranassoziiertes Protein; Regulation des Spektrin-Aktin Zellmembran-Skeletts; Interaktion mit Kalzium-Calmodulin und verschiedenen Proteinkinasen	(KIANG, LEUNG, 2018)
<i>CYP2U1</i> (<i>Cytochrome P450 family 2 subfamily U member 1</i>)	Enzym der Cytochrom-P450-Familie; Potenzieller Regulator der Immunzell-Funktion	(CHUANG et al., 2004; DHERS et al., 2017)
<i>DDX17</i> (<i>DEAD-box helicase 17</i>)	RNA-Helicase; Regulatorischer Einfluss auf Transkriptionsprozesse, zelluläre Signaltransduktion und RNA-Metabolismus	(CONNERTY et al., 2015; NGO et al., 2019; XING et al., 2019)
<i>EZH1</i> (<i>Enhancer of zeste 1 polycomb repressive complex 2 subunit</i>)	Protein der Polycomb-Gruppe; Negative Regulation von Transkriptionsprozessen	(MARGUERON et al., 2008)
<i>HERC3</i> (<i>HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 3</i>)	Ubiquitin-Ligase; Inhibition der NF-κB-gesteuerten Transkription	(HOCHRAINER et al., 2015)

4. Ergebnisse

Zielgen	Funktion des zugehörigen Proteins (Literaturrecherche)	Quelle
<p><i>IFT80</i> (<i>Intraflagellar transport 80</i>)</p>	<p>Bestandteil der intraflagellaren Transport-Maschinerie in Zellen mit Zilien; (Wahrscheinliche Bedeutung von ziliären Transportprozessen für die T-Zell-Funktion)</p>	<p>(BEALES et al., 2007; STEPHEN et al., 2018; WANG et al., 2018)</p>
<p><i>JMY</i> (<i>Junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor</i>)</p>	<p>Co-Aktivator der Protein p53-gesteuerten Transkription</p>	<p>(ADIGHIBE, PEZZELLA, 2018)</p>
<p><i>KDM5B</i> (<i>Lysine demethylase 5B</i>)</p>	<p>Modifikation von Histonen (Histon-Demethylase); Negative Regulation von Transkriptionsprozessen</p>	<p>(ZHENG et al., 2019)</p>
<p><i>LAT2</i> (<i>Linker for activation of T cells family member 2</i>)</p>	<p>Transmembranes Adaptorprotein; Feinregulation beim Aktivierungsprozess von Lymphozyten</p>	<p>(FULLER et al., 2011)</p>
<p><i>LDLRAP1</i> (<i>Low density lipoprotein receptor adaptor protein 1</i>)</p>	<p>Interaktion mit dem LDL (<i>low density lipoprotein</i>)-Membranrezeptor; Regulation von Endozytose-Prozessen und intrazellulärer Lokalisation</p>	<p>(SIRINIAN et al., 2005)</p>
<p><i>S100B</i> (<i>S100 calcium binding protein B</i>)</p>	<p>Kalzium bindendes Protein; Beteiligung an Kalzium gesteuerten Signalprozessen</p>	<p>(DONATO et al., 2009)</p>

4. Ergebnisse

Zielgen	Funktion des zugehörigen Proteins (Literaturrecherche)	Quelle
<p><i>SH3BP4</i> (SH3 domain binding protein 4)</p>	<p>Regulation der Endozytose des Transferrin-Rezeptors; (Transferrin-Rezeptor mit möglicher Bedeutung bei Signal-Amplifikation nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation)</p>	<p>(SALMERON et al., 1995; TOSONI et al., 2005)</p>
<p><i>SORL1</i> (Sortilin related receptor 1)</p>	<p>Intrazellulärer Rezeptor; Regulation von intrazellulärer Lokalisation</p>	<p>(SCHMIDT et al., 2017)</p>
<p><i>STARD8</i> (StAR related lipid transfer domain containing 8)</p>	<p>Aktivierung der Rho GTPase mit Funktionen für die Regulation des Zytoskeletts, die zelluläre Differenzierung und das Zellwachstum; Negative Regulation von Signalprozessen</p>	<p>(BRAUN, OLAYIOYE, 2015; MOON, ZHENG, 2003)</p>
<p><i>TADA2B</i> (Transcriptional adaptor 2B)</p>	<p>Adaptorprotein; Co-Aktivator bei Transkriptionsprozessen</p>	<p>(BARLEV et al., 2003)</p>
<p><i>TAF7</i> (TATA-box binding protein associated factor 7)</p>	<p>Regulatorische Funktion bei der Initiation von Transkriptionsprozessen</p>	<p>(GEGONNE et al., 2013)</p>
<p><i>ZFP36</i> (ZFP36 ring finger protein)</p>	<p>RNA-bindendes Protein; Zielgerichtete mRNA-Degradierung; Regulation von Signalprozessen</p>	<p>(GUO et al., 2017; MOORE et al., 2018)</p>

4.6. Etablierung und Validierung eines Verfahrens zur quantitativen Analyse der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten

Durch die Etablierung einer neuen Methodik zur Eichung des verwendeten Microarray-Analysesystems (der Firma Agilent Technologies), sollten Informationen zum molekularen Ausmaß der miRNA-Expression vor dem Hintergrund des T-Zell-Aktivierungsprozesses gewonnen werden. Das Eichverfahren wurde auf Grundlage von bereits bestehenden RNA-Quantifizierungsmethoden entwickelt. Bei diesen Verfahren findet die Eichung der Expressionsdaten durch die analoge Messung von Verdünnungsreihen synthetischer Oligonukleotide mit bekannter Quantität statt, welche der Sequenz der Ziel-Moleküle oder einem Konvolut verschiedener Ziel-RNAs entsprechen (BISSELS et al., 2009; BUSTIN, 2000). Dabei werden unterschiedliche Mengen der Oligonukleotid-RNAs in die Expressionsanalysen eingesetzt. Entsprechende relative Standardkurven können durch Messung vor dem Hintergrund einer zellulären RNA generiert werden, die ebenfalls die Ziel-Moleküle enthält und somit das Messergebnis entsprechend beeinflusst (BUSTIN, 2000; SVEC et al., 2015). Eine Messung zur absoluten Quantifizierung der Ziel-RNA-Moleküle kann vor dem Hintergrund einer nicht-kompetitiven RNA-Probe durchgeführt werden, welche für gleichbleibende Mengenverhältnisse innerhalb des Messvorganges sorgt, aber das spätere Messergebnis nicht entscheidend beeinflusst (BUSTIN, 2000; MIRANDA, STEWARD, 2017; SVEC et al., 2015).

4.6.1. Relative Quantifizierung von miRNA-Expressionsveränderungen

Zur Entwicklung der methodischen Vorgehensweise wurde ein Versuchsaufbau getestet, der auf Grundlage der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten die relative Quantifizierung von exemplarischen miRNA-Expressionsveränderungen im Vergleich zum Ruhezustand (0 h Zeitpunkt) ermöglichen sollte.

Auf Basis der Microarray-Daten wurden zunächst fünf miRNAs mit unterschiedlichem Verlaufsmuster und Ausmaß der zeitaufgelösten Expressionsveränderungen ausgewählt (miR-30c-5p, miR-132-3p, miR-155-5p, miR-221-3p und miR-182-5p). Zur Eichung wurden anschließend synthetische miRNA-Oligonukleotide dieser miRNAs zu verschiedenen Mengen auf einzelne Reaktionsansätze verteilt und mittels Microarray untersucht. Dabei wurde eine Hintergrund-RNA (RIN-Wert: 7,8) auf Basis einer inaktiven T-Zell-Probe (Ruhezustand) verwendet. Zusätzlich wurde ein Reaktionsansatz der Hintergrund-RNA ohne das Hinzufügen der Oligonukleotide vermessen. Bei der Auswertung der Eichexperimente wurden die Rohsignale der Microarray-Analysen zunächst bezüglich des Hintergrundrauschens korrigiert (Rohsignalwerte (Korrigiert)). Dazu wurden die Signalwerte von Kontrollsonden herangezogen, die in das Microarray-Chipsystem integriert sind (LOPEZ-ROMERO et al., 2010). Anschließend wurde das Messergebnis der Hintergrund-RNA von dem der Array-Reaktionen mit den hinzugefügten Oligonukleotiden subtrahiert, um die relativen Veränderungen in der Signalstärke im Zusammenhang mit den hinzugefügten Oligonukleotiden zu bestimmen (Relative Rohsignalwerte (Korrigiert)). Zur Ermittlung der Eichkurven wurde anschließend die jeweilige Menge des miRNA-Oligonukleotids (Ordinate) gegen die relative Änderung des Arraysignals (Abszisse) aufgetragen. Eine Übersicht zur methodischen Vorgehensweise ist nachfolgend in **Abbildung 21** dargestellt. Das zugehörige Bestimmtheitsmaß (R^2) lag für alle resultierenden Eichgeraden zwischen 0,9952 und 0,9997 (**Abbildung 22**, Seite 109).

4. Ergebnisse

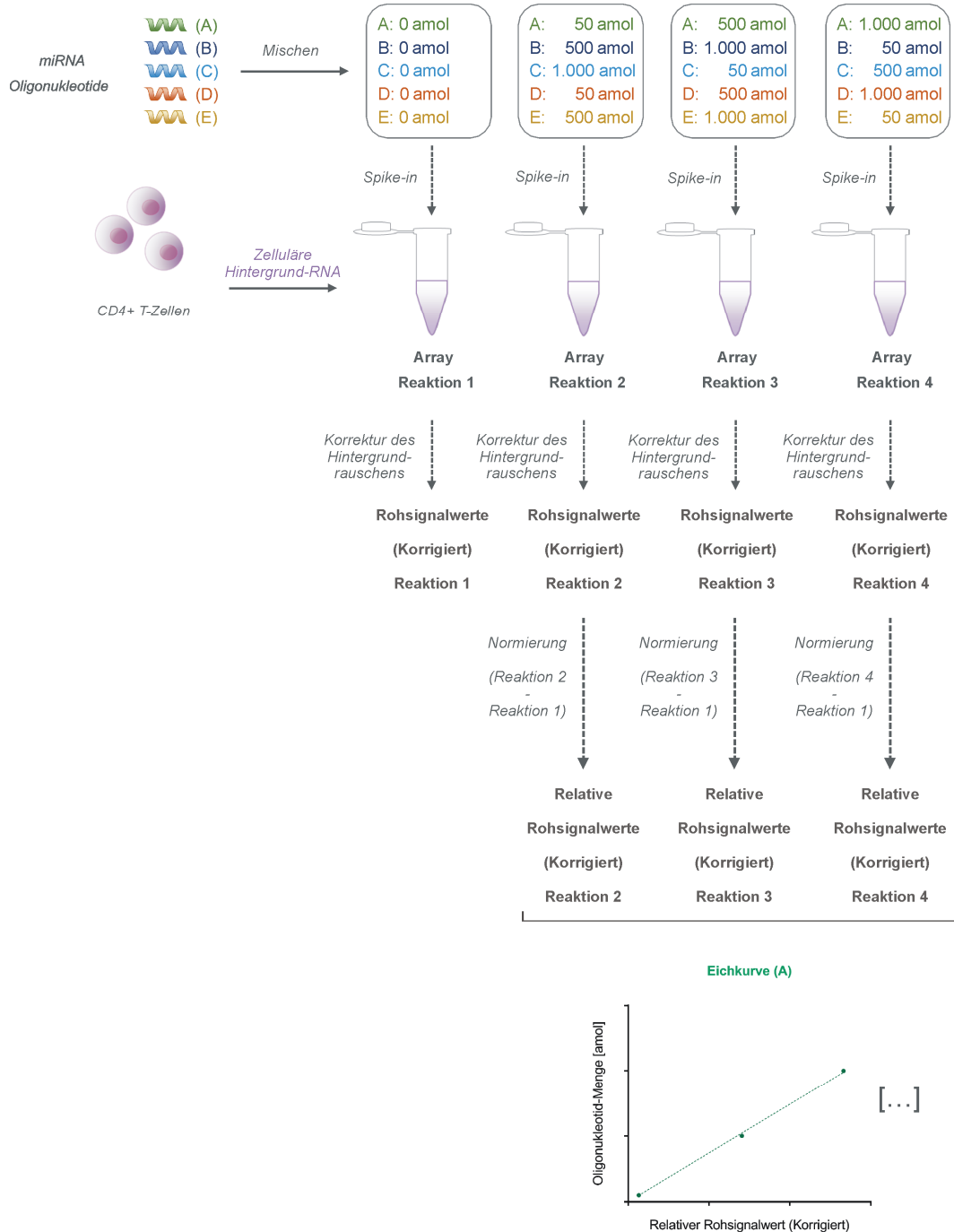


Abbildung 21: Methodische Übersicht zur Microarray-Eichung für die relative Quantifizierung der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten.

Zur Eichung des Microarray-Systems wurden zunächst synthetische miRNA-Oligonucleotide von fünf exemplarischen miRNAs als *spike-ins* zu verschiedenen Mengen auf einzelne Reaktionsansätze verteilt und vor dem Hintergrund einer RNA-Probe aus CD4+ T-Zellen im Ruhezustand vermessen. Im Anschluss an die Analyse wurden die Rohsignalwerte der entsprechenden miRNAs zunächst bezüglich des Hintergrundrauschens der Microarray-Messung korrigiert. Anschließend wurden die Ergebnisse anhand einer Kontrollmessung der Hintergrund-RNA ohne die hinzugefügten Oligonucleotide normiert, um so die relative Änderung der Rohsignalwerte zu bestimmen. Anhand der jeweiligen Menge des hinzugefügten Oligonucleotids und den relativen Rohsignalwerten wurden abschließend die zugehörigen Eichkurven bestimmt.

4. Ergebnisse

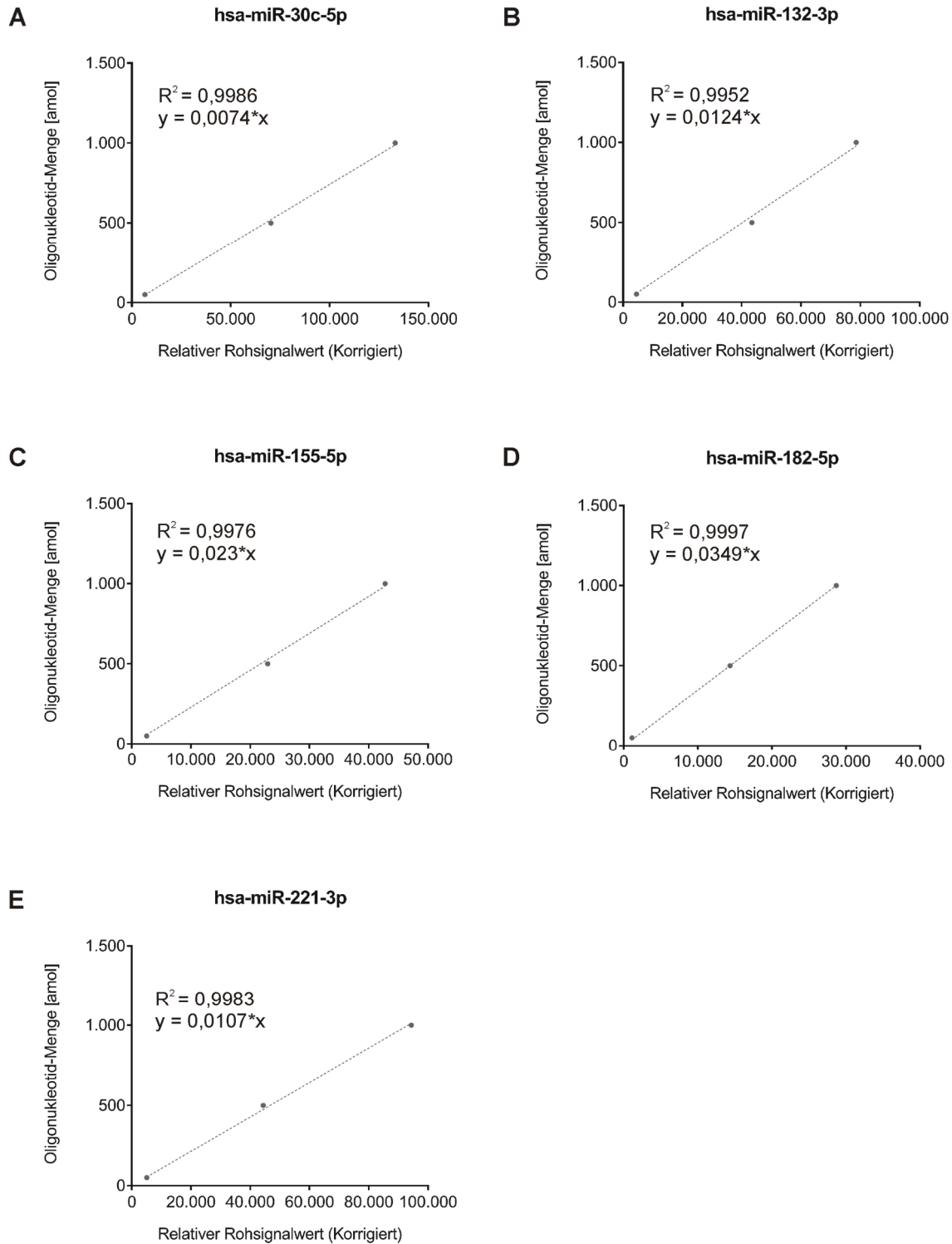


Abbildung 22: Eichgeraden zur relativen Quantifizierung von exemplarischen miRNA-Expressionsveränderungen im Vergleich zum zellulären Ruhezustand.

Die dargestellten Eichkurven zur relativen Quantifizierung der angegebenen miRNAs (A-E) wurden durch Messungen von entsprechenden Oligonukleotid-*spike-ins* vor dem RNA-Hintergrund einer inaktiven T-Zell-Probe (Ruhezustand) ermittelt. Sie beschreiben das Verhältnis zwischen den hinzugefügten Oligonukleotiden ([amol]; y-Achse) und den relativen Veränderungen in der Signalstärke (Relative Rohsignalwerte (Korrigiert); x-Achse) im Zusammenhang mit der Microarray-Analyse.

Durch das Verwenden der T-zellulären Hintergrund-RNA sollten vergleichbare Reaktionsbedingungen geschaffen werden, welche die spätere Quantifizierung der zeitaufgelösten miRNA-Daten in Relation zum zellulären Ruhezustand (0 h) ermöglichen würden. Zur Kontrolle wurde für die untersuchten miRNAs der Unterschied zwischen der Hintergrund-RNA der Eichung und den Median-Expressionswerten (Rohsignalwerte (Korrigiert)) der beiden Spender zum 0 h Zeitpunkt überprüft (Anhang, **Abbildung A 4**). Anhand eines maximalen Abweichungsbetrages der korrigierten Rohsignalwerte von weniger als 20,0 % konnte eine gute Vergleichbarkeit zwischen den experimentellen Daten der Eichung und der Zeitverlaufsanalysen gewährleistet und eine relative Quantifizierung der Zeitverlaufdaten durchgeführt werden.

Für die quantitative Auswertung wurden die Zeitverlaufdaten zu drei technischen Replikaten (0-24 h) pro Spender zusammengefasst. Die relativen Rohsignalwerte (Korrigiert) wurden anschließend in Relation zum jeweiligen 0 h Zeitpunkt bestimmt. Als Resultat wurde die relative Änderung der Stoffmenge ([amol]) innerhalb des Microarray-Ansatzes ermittelt. Anschließend wurde für jeden Ansatz eine Hochrechnung auf die RNA-Gesamtmenge innerhalb der jeweiligen Zeitverlaufprobe vorgenommen und die entsprechende Anzahl an Molekülen mithilfe der Avogadro-Konstanten bestimmt. Die molekularen Veränderungen pro Zelle wurden im Folgenden unter der Annahme einer konstant bleibenden Zellanzahl ($n=350.000$ ausgesäte Zellen/Zeitverlaufprobe) extrapoliert. Die Ergebnisse zu den relativen Expressionsänderungen der analysierten miRNAs sind auf der nachfolgenden Seite in **Abbildung 23** zusammengefasst. Beim Vergleich der jeweiligen Median-Ergebnisse zwischen dem 0 h und dem 24 h Zeitpunkt lag die relative Expressionsänderung der abnehmenden miR-30c-5p für den ersten Spender bei 13 Molekülen pro Zelle und für den zweiten Spender bei 17 Molekülen pro Zelle. Für die miR-132-3p mit plateauartigem Expressions-Verlauf zwischen 2 h und 24 h lag die entsprechende Zunahme der Expression im Median für Spender 1 zwischen 4-7 Molekülen pro Zelle und für Spender 2 zwischen 4-9 Molekülen pro Zelle. Die quantifizierte Zunahme der miR-155-5p-Expression betrug insgesamt 1.300 (Spender 1; Median) bzw. 1.357 Moleküle pro Zelle (Spender 2; Median) mit einer stündlichen Zunahme um etwa 60 Moleküle pro Zelle im Zeitraum zwischen 2 h und 24 h. Der Umfang der molekularen Expressionsänderungen für die nicht-signifikant veränderte miR-182-5p lag innerhalb des Zeitverlaufs im Median für beide Spender zwischen minus einem und einem Molekül pro Zelle. Die relative Expressionsänderung der miR-221-3p mit moderater Expressionszunahme, nach den initialen 2-4 h der Aktivierung, lag beim Vergleich der Median-Werte zwischen dem 0 h und dem 24 h Zeitpunkt für beide Spender bei 6 Molekülen pro Zelle.

4. Ergebnisse

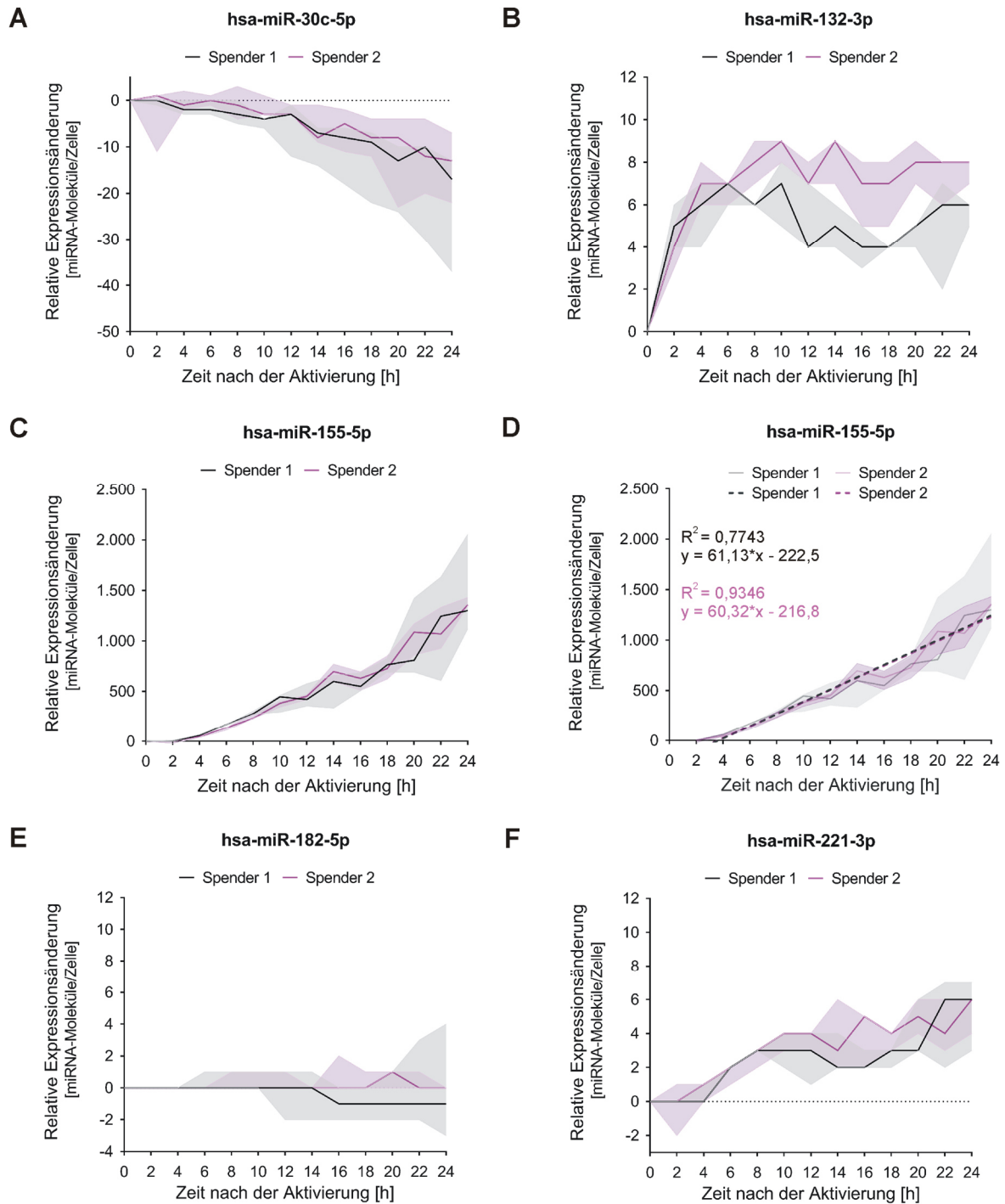


Abbildung 23: Relative Quantifizierung von miRNA-Expressionsveränderungen vor dem Hintergrund des zellulären Ruhezustands.

Im Zusammenhang mit dem Zeitverlauf der T-Zell-Aktivierung wurden auf Grundlage der Microarray-Daten für fünf exemplarische miRNAs (**A-C** und **E-F**) die relativen molekularen Expressionsänderungen [miRNA-Moleküle/Zelle] im Vergleich zum zellulären Ruhezustand (0 h) bestimmt. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung sind auf Basis dreier technischer Replikate (0-24 h) pro Spender als Median (Linie) und mit Angabe des Umfangs (Farblich hinterlegt) dargestellt. Für den starken Anstieg der miR-155-5p-Expression wurden zusätzlich die zugehörigen Regressionsgeraden bestimmt. Diese sind in Abbildungsteil (**D**) gestrichelt (für beide Spender nahezu überlappend), mit Angabe der Geraden-Gleichungen und mit den zugehörigen Bestimmtheitsmaßen (R^2) dargestellt.

Bereits bestehende Verfahren zur Quantifizierung der miRNA-Expression basieren häufig auf einer qPCR basierten Messmethodik (CHEN et al., 2005; SVEC et al., 2015). Zur Validierung der entwickelten Quantifizierungsmethode wurden daher vergleichende Taqman RT-qPCR-Analysen durchgeführt. Dazu wurden mithilfe der synthetischen Oligonukleotide analoge Eichkurven vor dem Hintergrund einer 0 h T-Zell-RNA-Probe bestimmt. Die Untersuchungen wurden exemplarisch für drei miRNAs (miR-132-3p, miR-155-5p und miR-221-3p) durchgeführt. Die resultierenden exponentiellen Kurvengleichungen (R^2 : 0,9958, 0,9946 und 0,9979; Anhang, **Abbildung A 5**) der Taqman RT-qPCR-Eichung wurden auf entsprechende Untersuchungsergebnisse der RNA-Zeitverlaufspalten angewendet. Sowohl das molekulare Ausmaß der miRNA-Expressionsänderungen in Relation zum 0 h Zeitpunkt als auch die zeitlichen Verlaufsmuster wiesen eine hohe Ähnlichkeit zwischen den Ergebnissen der qPCR- und der Microarray-Quantifizierung auf (**Abbildung 24**).

Auf Basis der vergleichbaren Ergebnisse durch ein bereits etabliertes Quantifizierungsverfahren konnte somit die Validität der erarbeiteten relativen Quantifizierungsmethodik bestätigt werden.

4. Ergebnisse

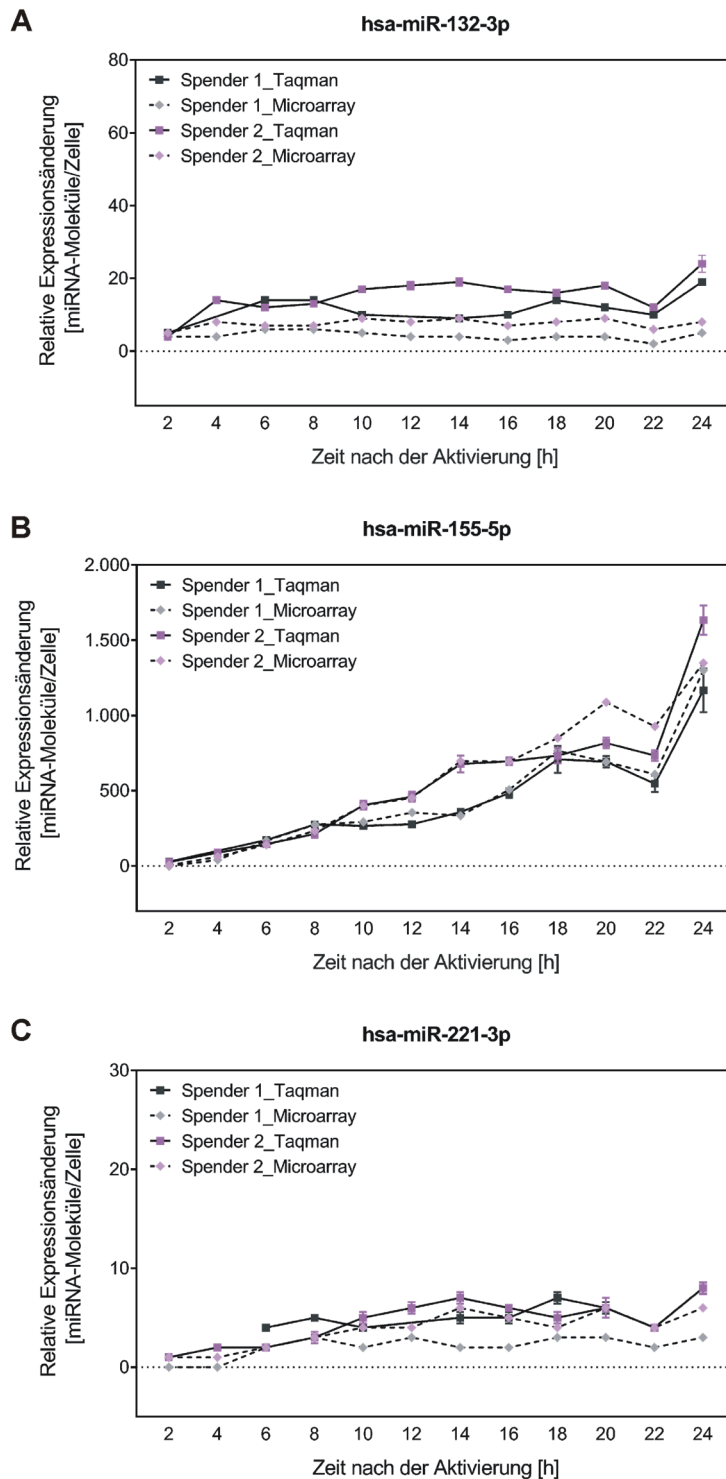


Abbildung 24: Vergleich zwischen den Ergebnissen der Microarray und der Taqman basierten relativen miRNA-Quantifizierung.

Die Expressionsänderungen im Zusammenhang mit der T-Zell-Aktivierung sind im relativen Vergleich zum Ruhezustand (0 h) für drei miRNAs (**A-C**) als Ergebnisse der Microarray basierten Quantifizierung (Median für jeden Spender; gestrichelte Linie) und als Resultate analoger Taqman-Analysen (Durchschnittswert aus Triplikat-Messung der gleichen cDNA-Probe; durchgängige Verlaufslinie) dargestellt.

4.6.2. Absolute Quantifizierung der miRNA-Expression

Für die quantitative Analyse der absoluten miRNA-Expressionswerte wurde die molekulare Eichung des Microarray-Systems vor dem Hintergrund einer nicht-kompetitiven RNA-Probe wiederholt. Dazu wurde eine virale RNA-Probe des MS2-Bakteriophagen als Hintergrund verwendet, welche nicht an den Array-Chip binden und somit das spätere Messergebnis nicht beeinflussen sollte. Es wurden Oligonukleotid *spike-ins* zu fünf unterschiedlichen miRNAs (miR-30c-5p, miR-132-3p, miR-155-5p, miR-221-3p und miR-182-5p) vermessen.

Zur Bestimmung einer universellen Eichkurve mit der die quantitative Analyse auf alle detektierten miRNAs ausgeweitet werden konnte, wurde das Durchschnittsergebnis der korrigierten Rohsignalwerte aus den Analysen aller miRNA *spike-ins* bestimmt. Der Zusammenhang zwischen den Durchschnittssignalwerten und der jeweiligen Oligonukleotid-Menge wurde als Eichkurve dargestellt (**Abbildung 25A**). Der zugehörige R^2 -Wert lag bei 0,9995. Die Übertragbarkeit der Eichkurve wurde anschließend in einem Kontrollexperiment getestet. Dazu wurden *spike-ins* von vier weiteren miRNA-Oligonukleotiden (miR-15a-5p, miR-17-5p, miR-150-5p und miR-223-3p) vor dem Hintergrund der MS2-Hintergrund-RNA-Probe vermessen und mithilfe der Kurven-Gleichung quantifiziert. Dabei konnte für die Quantifizierung der verschiedenen miRNAs eine unterschiedlich hohe Genauigkeit festgestellt werden. So zeigte beispielsweise die Quantifizierung der miR-223-3p für den Messbereich zwischen 50 amol und 5000 amol eine vergleichsweise geringe Genauigkeit. Der Bereich der Quantifizierungsvarianz lag dabei zwischen dem 1,63-fachen und dem 2,59-fachen der tatsächlichen *spike-in*-Menge. Die Ergebnisse der miR-17-5p wiesen hingegen auf eine hohe quantitative Genauigkeit hin, mit einer Varianz zwischen dem 0,93-fachen und dem 1,34-fachen der tatsächlichen *spike-in*-Menge. Im Gesamt-Durchschnitt konnte für die Quantifizierung der Oligonukleotid-*spike-ins* auf Grundlage der Eichkurve ebenfalls eine gute Genauigkeit bestätigt werden (**Abbildung 25B**). Dabei lag die durchschnittliche Abweichung für die quantifizierte Stoffmenge im Bereich von 0 amol bei +0,03 amol, von 50 amol bei +1 amol, von 500 amol bei -16 amol, von 1.000 amol bei +128 amol, von 2.000 amol bei +593 und von 5.000 amol bei +886 amol. Die durchschnittliche Varianz lag somit zwischen dem 0,97-fachen und dem 1,30-fachen der tatsächlichen Menge.

4. Ergebnisse

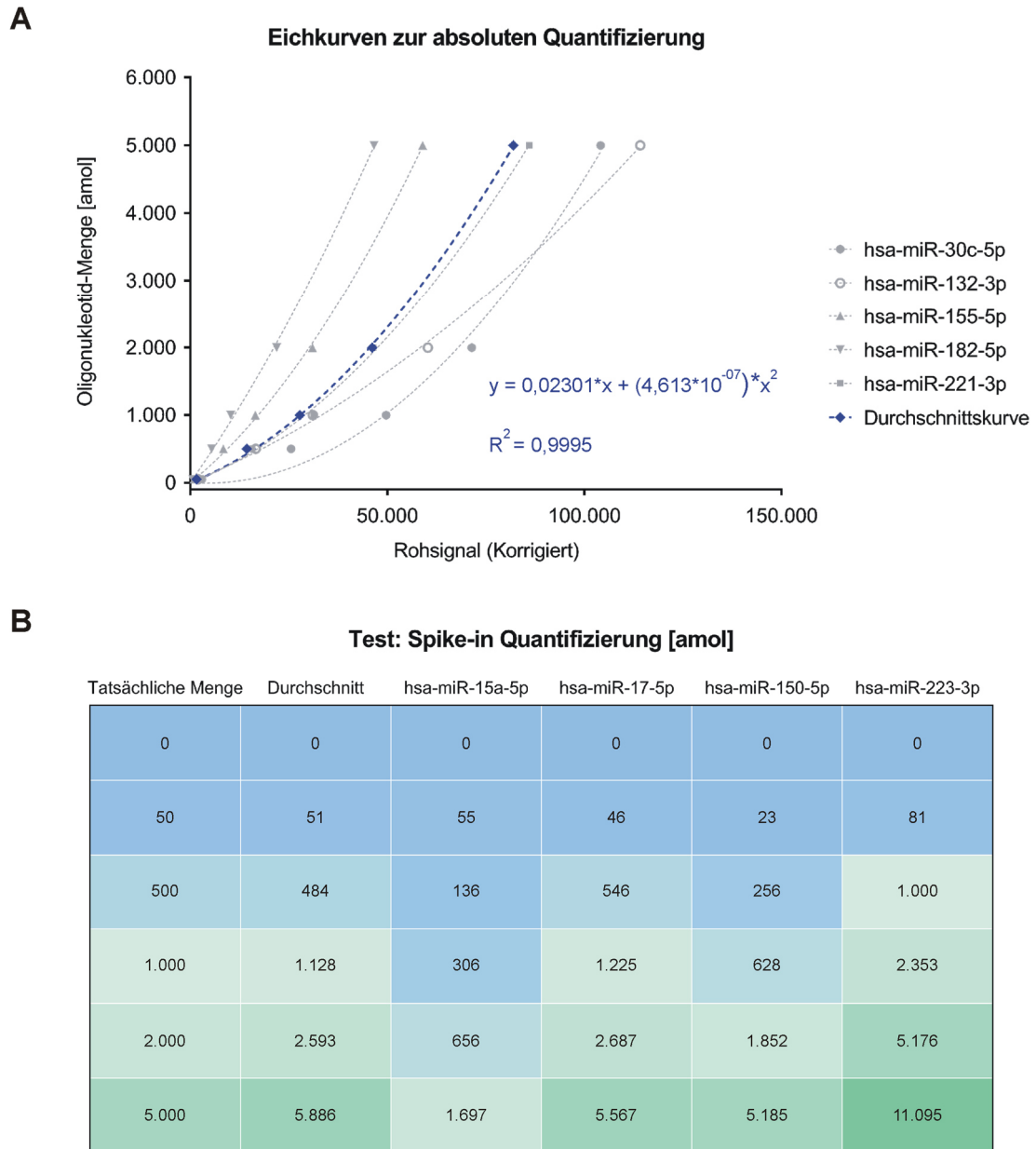


Abbildung 25: Bestimmung und Überprüfung einer universellen Eichkurve zur absoluten miRNA-Quantifizierung.

- A)** Mithilfe von *spike-ins* der angegebenen miRNAs-Oligonukleotide wurde eine Eichung des Microarray-Analysesystems vor dem Hintergrund einer nicht-kompetitiven RNA-Probe (MS2-Bakteriophagen-RNA) vorgenommen. D.h. die absolute Eichung wurde vor einer Hintergrund-RNA durchgeführt, welche neben den Oligonukleotid-*spike-ins* nicht an den Array-Chip binden und somit das spätere Messergebnis nicht beeinflussen sollte. Zur Bestimmung einer universellen Eichkurve wurde der Durchschnitt der Hintergrund-korrigierten Rohsignalwerte aus den Ergebnissen aller analysierten miRNA-Oligonukleotide (vergleiche Abbildungslegende) bestimmt.
- B)** Die Übertragbarkeit der durchschnittlichen Eichkurve wurde überprüft, indem *spike-ins* vierer weiterer miRNA-Oligonukleotide vor dem Hintergrund einer nicht-kompetitiven RNA-Probe vermessen und quantifiziert wurden. Die Ergebnisse der Quantifizierung [amol] sind mit Angabe der tatsächlichen Menge für die einzelnen *spike-ins* sowie als Durchschnittsergebnis für die Quantifizierung aller vier Oligonukleotide dargestellt. Die Quantifizierungsergebnisse sind in der Darstellung als gerundete Werte ohne Dezimalstellen angegeben.

Zur weiteren Kontrolle wurden die relativen Expressionsänderungen im Vergleich zum Ruhezustand auf Basis der absoluten Quantifizierungsergebnisse bestimmt. Die Ergebnisse wurden anschließend mit den Resultaten der vorangegangenen relativen Quantifizierung verglichen (Anhang, **Abbildung A 6**). Dabei konnte für die verglichenen miRNAs eine gute Übereinstimmung für den molekularen Bereich der quantifizierten miRNA-Expressionsveränderungen bestätigt werden.

Insgesamt konnte die universelle Eichkurve somit für eine angenäherte quantitative Abschätzung der miRNA-Expression im Zusammenhang mit den Zeitverlaufsdaten genutzt werden.

4.7. Detektion von miRNAs mit prominenter molekularer Expression

Um grundlegende Informationen zum molekularen Bereich der miRNA-Expression im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses zu erlangen, wurde mithilfe der universellen Eichkurve (Kapitel 4.6.2. Absolute Quantifizierung der miRNA-Expression) eine quantitative Auswertung der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten vorgenommen und sowohl der Bereich der maximalen Expressionsmenge als auch der maximalen Expressionsveränderung während des Zeitverlaufs zwischen den unterschiedlichen microRNAs verglichen.

Die Etablierung einer adäquaten Dosierung stellt aktuell eine Herausforderung für die Entwicklung von microRNA-basierten Therapieansätzen dar (LAI et al., 2019; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017). Somit könnten die im Folgenden beschriebenen quantitativen microRNA-Expressionsinformationen im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses eine mögliche Datengrundlage für die Entwicklung einer physiologisch-angepassten zellulären microRNA-Dosierung bilden (zusätzlich weiter ausgeführt in Kapitel 4.9.).

Die Kurvengleichung wurde auf die Expressionsdaten der Zeitverlaufsanalysen angewendet, um die detektierte Stoffmenge pro Arrayreaktion für alle 815 detektierten miRNAs zu bestimmen (\rightarrow amol/Reaktion). Da die quantifizierte Expressionsmenge der miR-7975 (18.010-42.638 amol) sowie der miR-7977 (3.898-16.330 amol) für einigen Analysen außerhalb des kalibrierten Messbereichs (bis 5.000 amol) lag, wurde die Quantifizierung dieser miRNAs lediglich unter der Annahme eines gleichbleibenden Verlaufs der erweiterten Eichkurve extrapoliert. Die zugehörige molekulare Expression pro Arrayreaktion wurde mithilfe der Avogadro-Konstanten (N_A ; [Teilchen (Moleküle)/mol]) berechnet. Das heißt die molekularen miRNA-Expressionsmengen wurden in Bezug auf die (in die Reaktion eingesetzten) 75 ng der zellulären Gesamt-RNA-Probe ermittelt (\rightarrow Moleküle/75 ng).

Im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der quantitativen Expressionsdaten konnte eine gute Vergleichbarkeit für alle Zeitverlaufsanalysen festgestellt werden (vergleiche Anhang, **Abbildung A 7** und **Abbildung A 8**). Zur Vereinfachung des umfangreichen Datensatzes wurde die Quantifizierung daher als Gesamtergebnis für alle Zeitverlaufsanalysen ausgewertet. Dabei wurde das Median-Ergebnis für jeden Zeitpunkt auf Grundlage von beiden Spendern und von allen analysierten Zellproben, das heißt von insgesamt sechs Untersuchungen pro Zeitpunkt, bestimmt.

Bei der Analyse von jeweils 75 ng der zellulären Gesamt-RNA lag für die Mehrzahl der detektierten miRNAs das Maximum der quantifizierten Expressionsmenge in einem Bereich zwischen $4,337 \times 10^5$ und $9,992 \times 10^5$ Molekülen ($n=608$ von $n(\text{Gesamt})=815$; entsprechend 75 %). Für die übrigen 207 miRNAs betrug die maximale Expression zwischen $1,003 \times 10^6$ und $2,098 \times 10^{10}$ Molekülen. Für nur 14 miRNAs lag die quantifizierte Expressionsmenge dabei oberhalb von 10^8 Molekülen.

In Bezug auf die maximale Expressionsveränderung innerhalb des analysierten Zeitraumes zeichnete sich ein ähnlicher Trend ab. Von der zuvor beschriebenen miRNA-Gruppe mit prominenter Expressionsmenge ($>10^6$ Moleküle/75 ng; $n=207$), war für lediglich 92 miRNAs gleichzeitig auch eine vergleichsweise starke Expressionsänderung um mehr als 10^6 Moleküle im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses zu verzeichnen (vergleiche Anhang, **Tabelle A 4**). Der Bereich der Expressionsänderung lag dabei zwischen $1,004 \times 10^6$ und $5,294 \times 10^9$ Molekülen. Die Mehrzahl der miRNAs zeigte geringere Expressionsänderungen (Bereich zwischen $2,465 \times 10^4$ und $9,982 \times 10^5$ Molekülen; $n=723$ von $n(\text{Gesamt})=815$; entsprechend 89 %).

Zur weiteren Aufschlüsselung der beschriebenen Expressionstrends wurde die molekulare miRNA-Expression pro Zelle extrapoliert. Dazu wurde die jeweilige Gesamtmenge der extrahierten zellulären RNA-Probe in die Kalkulation einbezogen und die zelluläre Expressionsmenge unter Annahme einer konstant bleibenden Zellanzahl (350.000 Zellen/Zeitverlaufsprobe) berechnet. Die Quantifizierung wurde als Gesamtergebnis für alle Zeitverlaufsanalysen ausgewertet (n=6 Untersuchungen pro Zeitpunkt).

In Hinsicht auf die maximale Expressionsmenge (**Abbildung 26 A und B**) war für 683 der 815 miRNAs innerhalb des gesamten Analysezeitraumes eine vergleichsweise geringe Expression von weniger als 20 Molekülen/Zelle zu verzeichnen (entsprechend 84 %). Von den verbleibenden 132 miRNAs (entsprechend 16 %) wiesen 16 eine maximale Expressionsmenge von mehr als 1.000 Molekülen/Zelle auf. Darunter lag die Expression für 38 miRNAs oberhalb von 100 Molekülen/Zelle. Weitere 78 miRNAs entsprachen weiterhin einer maximalen Expressionsmenge von mindestens 20 Molekülen/Zelle. Insgesamt lag der Bereich der maximalen Expressionswerte für alle detektierten miRNAs zwischen 7 und 317.271 Molekülen/Zelle. Unter Ausschluss der miR-7975 und der miR-7977, deren Signalwerte zeitweise außerhalb des geeichten Messbereiches lagen und deren quantitative Daten somit lediglich unter der Voraussetzung bestand hatte, dass die Eichkurve auch außerhalb des kalibrierten Signalbereiches ihre Gültigkeit beibehält, lag die obere Grenze der maximalen Expressionsmenge mit der miR-142-3p bei 9.829 Molekülen/Zelle.

In Bezug auf die maximalen Zeitverlaufsveränderungen (**Abbildung 26A und C**) war für 734 der 815 detektierten miRNAs (entsprechend 90 %) eine maximale Expressionsänderung um weniger als 20 Moleküle/Zelle zu verzeichnen. Von den verbleibenden 81 miRNAs (entsprechend 10 %) wiesen lediglich 10 eine Expressionsänderung von mehr als 1.000 Molekülen/Zelle, weitere 24 miRNAs von mehr als 100 Molekülen/Zelle und 47 eine Änderung von mindestens 20 Molekülen/Zelle auf.

Insgesamt lag der quantifizierte Bereich der maximalen Expressionsänderung für alle detektierten miRNAs zwischen 3 und 182.876 Molekülen/Zelle. Unter Ausschluss der miR-7975 und der miR-7977, lag die obere Grenze der ermittelten Expressionsveränderungen mit der miR-150-5p bei 2.990 Molekülen/Zelle. Diese zeigte innerhalb des Zeitverlaufes eine Reduktion von 9.762 auf 6.772 Molekülen/Zelle.

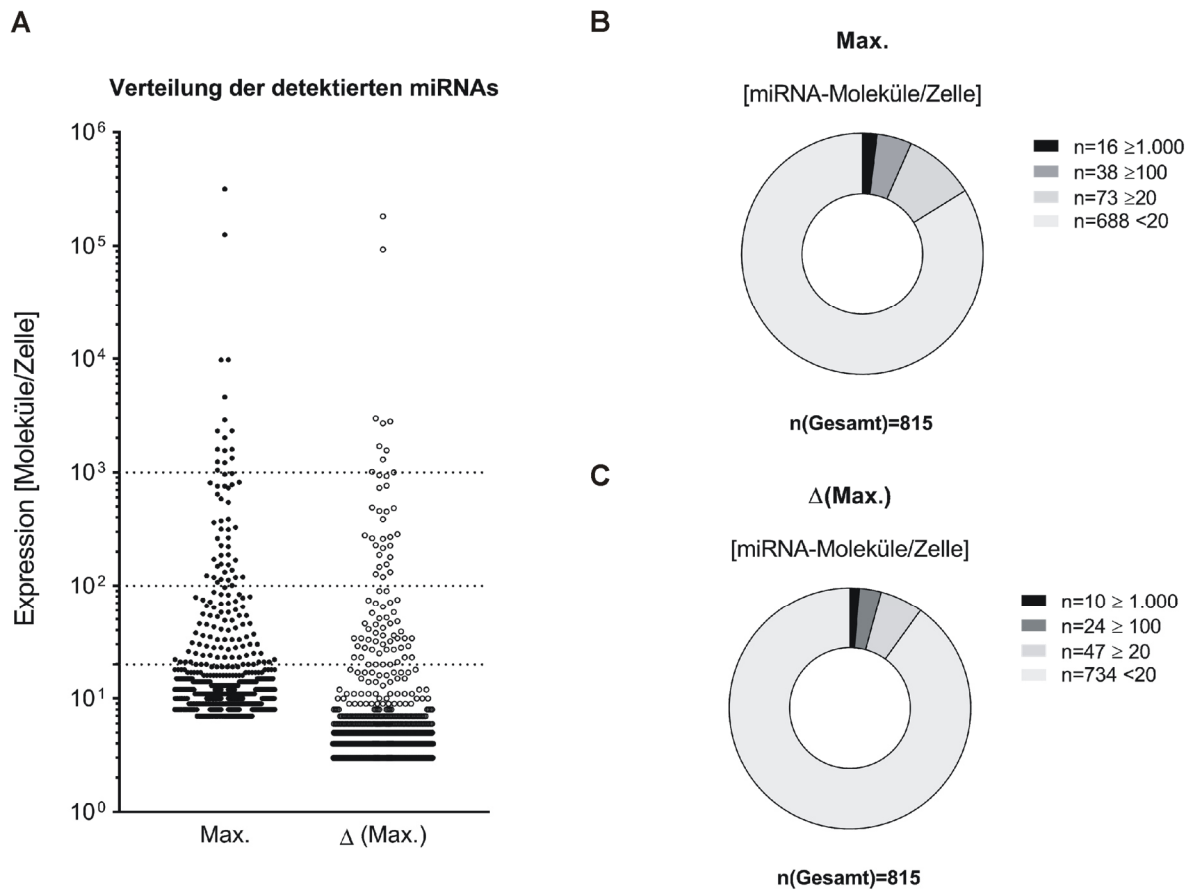


Abbildung 26: Verteilung der detektierten miRNAs bezüglich der maximalen molekularen Expressionsmenge sowie der maximalen Expressionsänderung.

Im Zusammenhang mit den Zeitverlaufsanalysen der T-Zell-Aktivierung wurde die zelluläre Expression der detektierten miRNAs quantitativ abgeschätzt. Die Ergebnisse der absoluten miRNA-Quantifizierung wurden gemeinsam für beide Spender (Spender 1 und 2), das heißt auf Grundlage von insgesamt sechs Proben pro Zeitpunkt, ausgewertet. Dazu wurde das Median-Ergebnis bestimmt [Moleküle/Zelle]. Die dargestellten Diagramme zeigen die anteilige Verteilung der miRNAs in Bezug auf den quantifizierten Betrag der maximalen Expressionsmenge (Max.; **A** und **B**) und in Bezug auf den quantifizierten Betrag der maximalen Expressionsänderung innerhalb des analysierten Zeitraumes (Δ (Max.); Differenz zwischen maximaler und minimaler Expressionsmenge; **A** und **C**). Die molekularen Expressionswerte wurden dazu in verschiedene Kategorien (<20, \geq 20, \geq 100 und \geq 1.000 Moleküle/Zelle) eingeteilt. Die Kategorien sind in den Legenden der Ringdiagramme (**B** und **C**) jeweils mit der enthaltenen Anzahl an miRNAs angegeben.

4. Ergebnisse

Von den miRNAs (n=39), welche im Zusammenhang mit der Auswertung der \log_2 -Expressionsdaten als mögliche Regulatoren des T-Zell-Aktivierungsprozesses identifiziert wurden (Kapitel 4.3. Identifizierung von miRNAs mit deutlicher und reproduzierbarer Expressionsveränderung im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses), wiesen 7 miRNAs eine maximale Expressionsmenge zwischen 9 und 18 Molekülen/Zelle auf (miR-630, miR-30e-3p, miR-5787, miR-5703, miR-1275, miR-4521 und miR-132-5p). Für die übrigen 32 miRNAs lag diese zwischen 20 (miR-18b-5p) und 2.320 Molekülen/Zelle (miR-21-5p). In Bezug auf die maximalen Expressionsveränderungen zeigten 16 miRNAs Änderungen zwischen 4 und 18 Molekülen/Zelle (miR-30c-5p, miR-221-3p, miR-132-3p, miR-1290, miR-155-3p, miR-20a-3p, miR-18b-5p, miR-3196, miR-630, miR-5703, miR-5787, miR-125b-5p, miR-4521, miR-132-5p, miR-30e-3p und miR-1275). Für die 23 verbleibenden miRNAs lag die Änderung innerhalb des Zeitverlaufs zwischen 32 (miR-29b-1-5p) und 1.703 Molekülen/Zelle (miR-21-5p) (**Abbildung 27**).

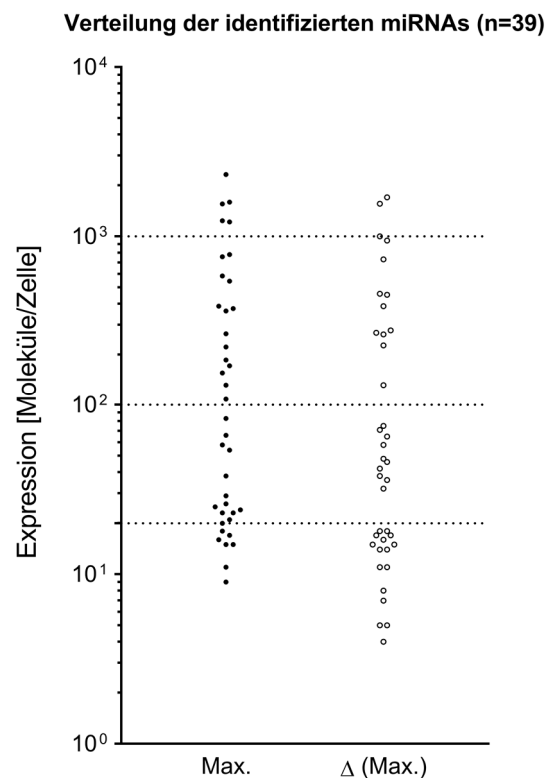


Abbildung 27: Verteilung der identifizierten miRNAs (n=39) bezüglich der maximalen Expressionsmenge sowie der maximalen Expressionsänderung.

Die Verteilung der miRNAs (n=39), welche im Zusammenhang mit der Auswertung der \log_2 -Microarray-Expressionsdaten identifiziert wurden, ist (wie bereits in Abbildung 26 beschrieben) in Bezug auf den quantifizierten Betrag der maximalen Expressionsmenge (Max) und in Bezug auf den quantifizierten Betrag der maximalen Expressionsänderung (Δ (Max.)) innerhalb des analysierten Zeitraumes dargestellt.

Anhand der molekularen Quantifizierungsdaten ist daher im Zusammenhang mit der initialen T-Zell-Aktivierungsphase lediglich von einer limitierten Anzahl prominent exprimierter miRNAs und darunter einer vergleichsweise geringen Anzahl an miRNAs mit vergleichsweise starker molekularer Expressionsveränderung auszugehen.

4.8. Identifizierung und funktioneller Nachweis von kooperativen miRNA-Paaren

Durch funktionelle Interaktionen kann es bei simultaner Expression von bestimmten miRNAs zu einer veränderten Wirkung auf gemeinsame Zielgene kommen (GRIMSON et al., 2007; LAI et al., 2019). Auf Grundlage von kooperativen 3'UTR-Bindestellen kann dabei die Bindung eines miRNA-geladenen RISCs die Bindungsfähigkeit weiterer miRNA-geladener RISCs auf physikalischem Wege fördern oder die Wirkung von einzelnen miRNAs funktionell summiert werden. Man spricht daher von Bindungskooperativität (*binding cooperativity*) beziehungsweise funktioneller miRNA-Kooperativität (*functional cooperativity*) (BRODERICK et al., 2011; GRIMSON et al., 2007; LAI et al., 2019).

Zur Charakterisierung der miRNA-Wirkung sollten im Zusammenhang mit dem T-Zell-Aktivierungsprozess funktionell interagierende miRNA-Paare bestimmt werden. Vorangegangene Expressionsstudien weisen auf eine Korrelation zwischen der miRNA-Expressionsrate und der regulatorischen miRNA-Wirkung hin (BROWN et al., 2007). Für eine kooperative miRNA-Funktionalität mit breitem regulatorischem Einfluss wurden daher sowohl starke Expressionsveränderungen als auch ein gemeinsames Zielgenspektrum vorausgesetzt.

Als Ausgangskandidaten für die Bestimmung der zentralen miRNA-Paarungen wurden die miRNAs gewählt, welche als Reaktion auf den Aktivierungsstimulus sowohl bei der Auswertung der \log_2 -Microarray-Expressionsdaten deutliche und reproduzierbare Expressionsveränderungen aufwiesen als auch auf Basis der quantitativen Analysen eine vergleichsweise starke molekulare Änderungen (>20 Moleküle/Zelle) zeigten (n=23; vergleiche Kapitel 4.3. und 4.7.). 15 dieser miRNAs zeigten eine Expressionszunahme zwischen 32 und 1.703 Molekülen/Zelle (**Abbildung 28A**) und acht eine Expressionsabnahme zwischen 36 und 264 Molekülen/Zelle (**Abbildung 28B**).

4. Ergebnisse

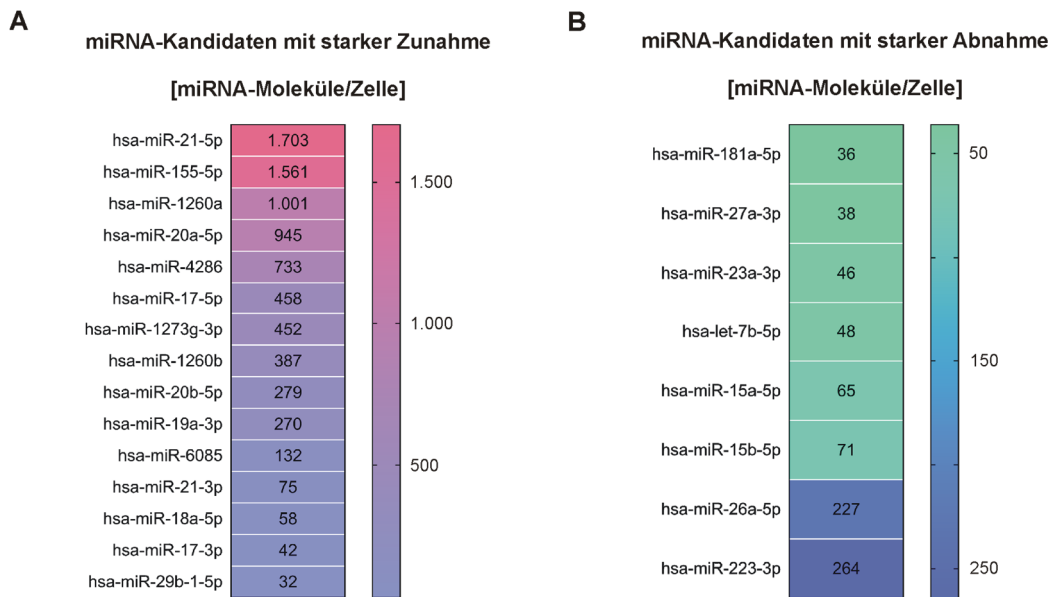


Abbildung 28: Molekulare Expressionsänderungen der miRNAs, welche als Ausgangskandidaten für die Bestimmung der funktionell interagierenden miRNA-Paare dienen.

Im Zeitverlauf der T-Zell-Aktivierung konnten für die dargestellten miRNAs, neben deutlichen und reproduzierbaren Veränderungen bei der Auswertung der \log_2 -Microarray-Expressionsdaten, auch auf Basis der quantitativen Informationen vergleichsweise starke Expressionsänderungen in Form einer Zu- (A) oder Abnahme (B) von mehr als 20 Molekülen/Zelle festgestellt werden.

Auf Basis eines gemeinsamen Zielgen-Spektrums sollten im Folgenden miRNA-Paarungen mit möglicher kooperativer Funktionsweise bestimmt werden. Dazu wurden die zugehörigen Zielgen-Netzwerke der miRNA-Kandidaten graphisch mithilfe des „miRTargetLink“ Webservice-Tools erstellt (HAMBERG et al., 2016). Als Voraussetzung für die zugrundeliegenden Informationsdaten wurde eine zuverlässige experimentelle Validierung der bereits bekannten miRNA-Zielgen-Beziehungen gewählt („strong evidence“) (HAMBERG et al., 2016). Aufgrund von fehlenden Zielgen-Informationen, wurden somit einige miRNAs (miR-21-3p, miR-29b-1-5p, miR-1260a, miR-1273g-3p, miR-4286 und miR-6085) von der Analyse ausgeschlossen.

In den resultierenden Netzwerken wurden prägnante Knotenpunkte bestimmt, welche aus miRNAs mit multiplen überlappenden Zielgenen bestanden. Innerhalb des Netzwerks der zunehmenden miRNA (**Abbildung 29A**) konnte ein Knotenpunkt mit 31 überlappende Zielgene für die miR-20a-5p und die miR-17-5p nachgewiesen werden. Die funktionelle Einsortierung der überlappenden Zielgene (BACKES et al., 2007) wies neben der Involvierung in die Zellzyklus-Regulation und die zelluläre Reifung zudem im Zusammenhang mit dem Notch-Signalweg auf zentrale Funktionen für die Regulation des T-Zell-Differenzierungsprozesses und die T-Zell-Immunreaktion hin (BRANDSTADTER, MAILLARD, 2019). Des Weiteren konnte ein Knotenpunkt aus acht gemeinsamen Zielgenen für die miR-155-5p und die miR-21-5p identifiziert werden. Diese waren funktionell vor allem an der Regulation von Signalwegen der Immunzell-Aktivierung beteiligt. Innerhalb des Netzwerks der abnehmenden miRNA (**Abbildung 29B**) wiesen die miRNAs miR-26a-5p und let-7b-5p neun überlappende Zielgene auf. Die Einsortierung ergab dabei Funktionen im Zusammenhang mit der Regulation der Zellseneszenz sowie der negativen Regulation des zellulären Metabolismus und der Translation.

4. Ergebnisse

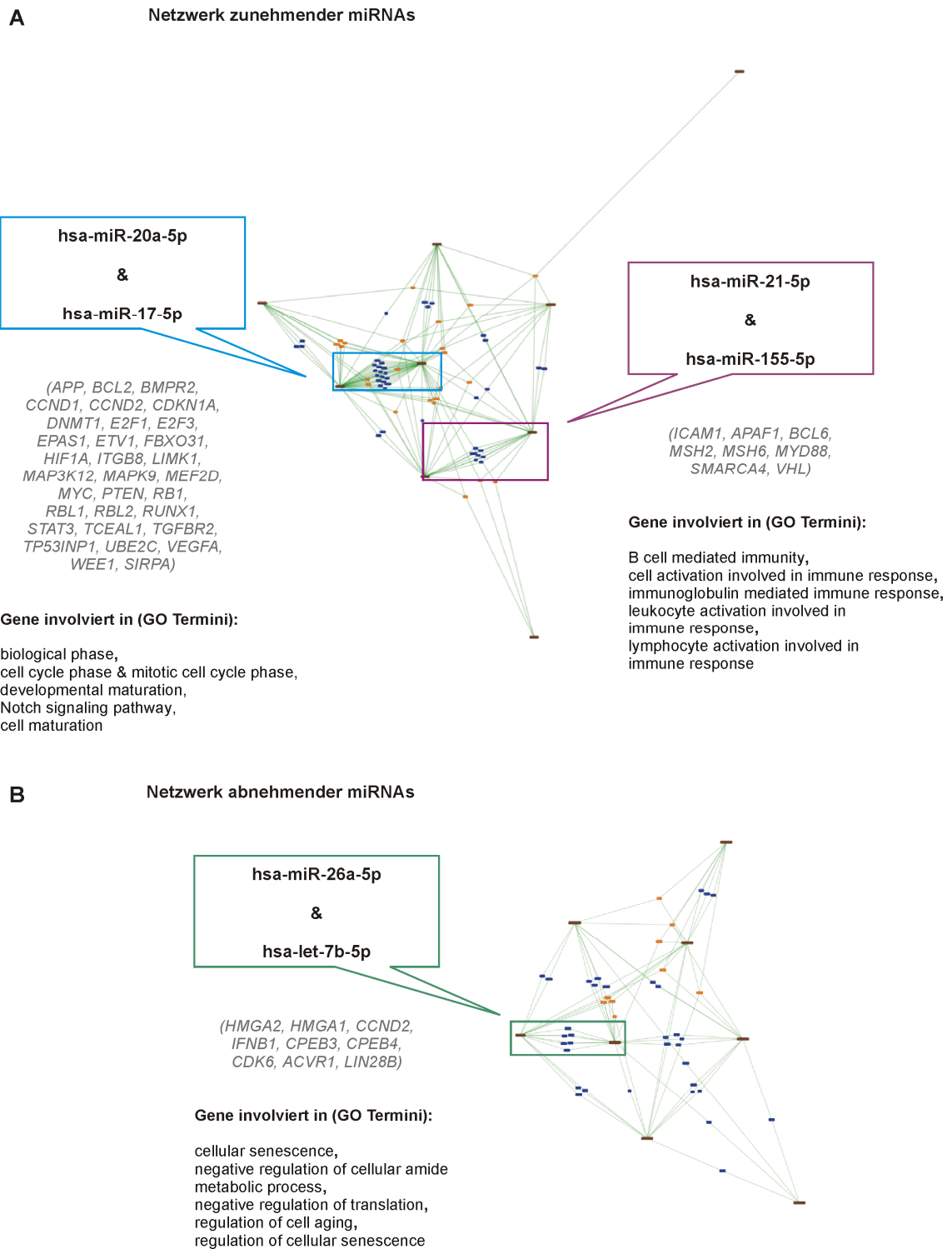


Abbildung 29: MiRNA-Zielgen-Netzwerke zur Identifizierung von miRNA-Paarungen mit möglicher kooperativer Funktion im Zusammenhang mit der intialen T-Zell-Aktivierungsphase.

MiRNA-Zielgen-Netzwerke wurden mithilfe des *Online-Tools* „MiRTargetLink“ (HAMBERG et al., 2016) generiert und exportiert. Prägnante Knotenpunkte mit multiplen überlappenden Zielgenen sind für die zu- (A) und abnehmenden miRNAs (B) graphisch hervorgehoben. Die zugehörige funktionelle Einsortierung der überlappenden Zielgene ist anhand von repräsentativen Termini der Gene Ontology (GO) Kategorie: „Biological Process“ dargestellt (STOCKEL et al., 2016; THE GENE ONTOLOGY, 2019).

Für das molekular am stärksten veränderte Paar der miR-155-5p und miR-21-5p sollte die Hypothese der regulatorischen Kooperativität exemplarisch auf Grundlage von zusätzlichen Zielgen-Testungen verifiziert werden. Dabei lag der quantifizierte Expressionsanstieg innerhalb des Zeitverlaufs der T-Zell-Aktivierung im Maximum jeweils bei 1.561 und 1.703 Molekülen pro Zelle im Vergleich zum zellulären Ruhezustand.

Zur Bestimmung von möglichen kooperativen miRNA-Zielgenen wurden 3'UTR-Bindestellen mithilfe von „miRWalk 2.0“ unter dem Kriterium einer stabilen Vorhersage durch mindestens fünf der integrierten Datenbanken vorhergesagt (DWEAP, GRETZ, 2015). Anschließend wurde die Schnittmenge der gemeinsam vorhergesagten Zielgene bestimmt (n=708 potenzielle Zielgene mit gemeinsamer Vorhersage für die miR-155-5p und die miR-21-5p). Da eine geringe Distanz von 8-40 nt zwischen Bindestellen eine entscheidende Voraussetzung für die kooperative Funktionsweise von miRNA-Bindestellen zu sein scheint (GRIMSON et al., 2007), wurden zwei potenzielle gemeinsame Zielgene (*IL1RAP* und *LEMD3*) auf Basis nahegelegener Bindestellen, einer möglichen Rolle für die T-Zell-Funktion und einer mRNA-Abnahme im Zusammenhang mit den Zeitverlaufsanalysen für die exemplarische Testung mittels dualem Luciferase-Assay ausgewählt. Bei der Testung wurden Co-Transfektionen des leeren Effektorplasmids (pSG5), der miR-155 (pSG5-leer und pSG5-miR-155 (1:1)), der miR-21 (pSG5-leer und pSG5-miR-21 (1:1)) oder beider miRNAs (pSG5-miR-155 und pSG5-miR-21 (1:1)) vorgenommen. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde die transfizierte Gesamt-Menge der Effektorplasmid-DNA sowie die anteiligen Mengen der pSG5-miR-155- und pSG5-miR-21-Plasmide für alle Analysen konstant gehalten.

Im Falle der analysierten *IL1RAP*-3'UTR-Sequenz wurden nahegelegene Bindestellen der miR-155-5p und miR-21-5p mit einer Distanz von 40 nt vorhergesagt (**Abbildung 30A**), welche somit dem Kriterium der Sequenznähe potenzieller kooperativer Bindestellen entsprachen (GRIMSON et al., 2007). Daneben wurde für den peripheren Sequenzbereich noch jeweils eine zusätzliche Bindestelle für die beiden miRNAs vorhergesagt. Eine potenzielle miR-155-5p-Bindestelle lag dabei mit einer Distanz von 642 nt im 3'-Bereich vor der bereits beschriebenen miR-155-5p-Bindestelle und eine mögliche miR-21-5p-Bindestelle mit einer Distanz von 375 nt im 5'-Bereich hinter der bereits beschriebenen miR-21-5p-Bindestelle. Bei dem Genprodukt des *IL1RAP*-Gens handelt es sich um einen Bestandteil des Interleukin-1-Rezeptor-Komplexes, welcher durch die Interaktion mit verschiedenen Zytokinen an der Modulation von aktivierungs- und differenzierungs-assoziierten T-Zell-Signalwegen beteiligt ist (ALI et al., 2007; CHACKERIAN et al., 2007). Für die zugehörige mRNA konnte nach 24 h eine Abnahme mit einem *Fold Decrease* von 1,62 (Spender 1; Median-Ergebnis) bzw. 2,04 (Spender 2; Median-Ergebnis) im Vergleich zum 0 h Zeitpunkt beobachtet werden.

Anhand einer Reduktion der relativen Luciferase-Aktivität im Zusammenhang mit der miR-155-5p (p-Werte $5,35 \times 10^{-7}$), konnte eine miRNA-Zielgen-Beziehung für die miR-155-5p und das *IL1RAP*-Gen bestätigt werden (**Abbildung 30B**). Dabei lag die Luciferase-Aktivität des zugehörigen 3'UTR-Konstruktes im relativen Vergleich zum leeren Reporterplasmid bei 51,2 % (SEM: $\pm 3,8$). Für die Analyse des miR-21-5p-Effektes war kein signifikanter Effekt im Zusammenhang mit der miRNA-Überexpression zu beobachten. Die zugehörige relative Luciferase-Aktivität lag im Vergleich zum leeren Reporterplasmid bei 96,8 % (SEM: $\pm 7,7$; $p=0,71$). Im Zusammenhang mit der Überexpression beider miRNAs war erneut eine signifikante Reduktion der relativen Luciferase-Aktivität zu verzeichnen 44,7 % (SEM: $\pm 4,5$; $p=2,80 \times 10^{-7}$). Der Effekt unterschied sich jedoch nicht signifikant vom Einzeleffekt der miR-155-5p ($p=0,29$). Daher ergaben sich durch die Testung der *IL1RAP*-3'UTR keine Hinweise auf eine kooperative Funktionsweise der miR-155-5p und der miR-21-5p.

4. Ergebnisse

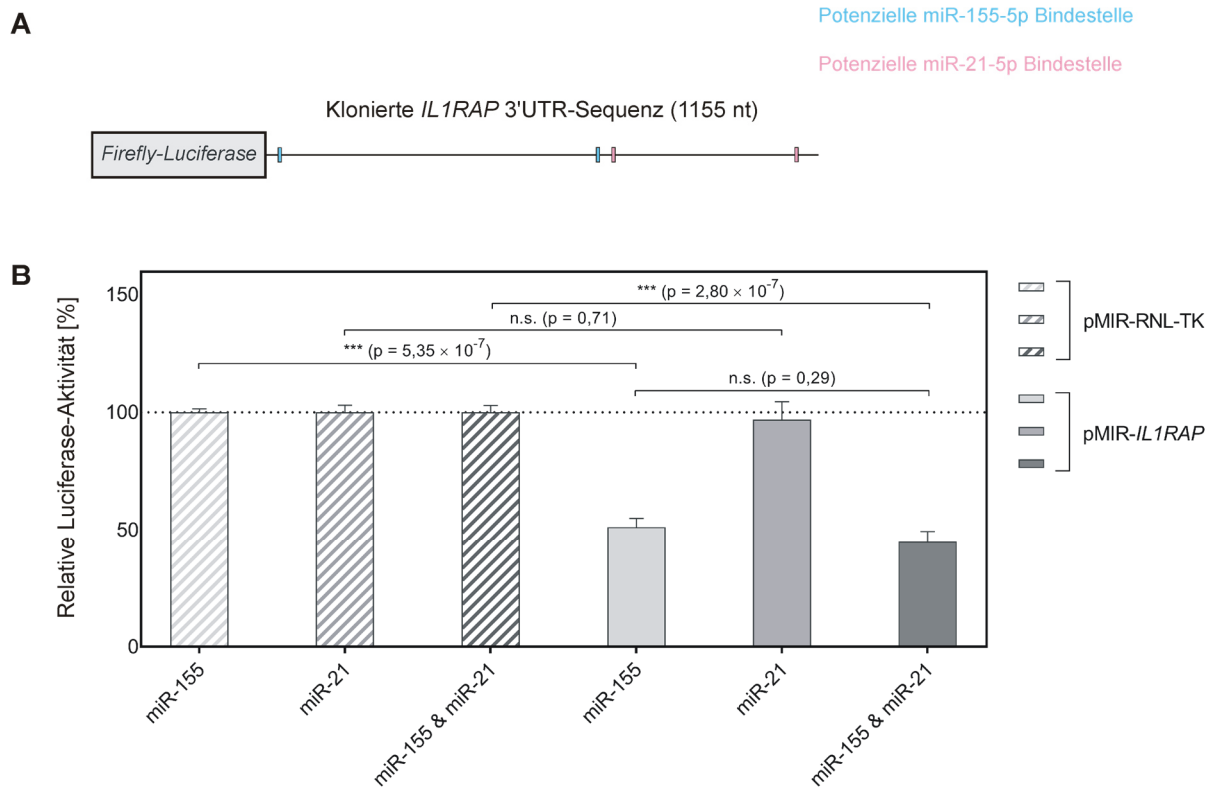


Abbildung 30: Duale Luciferase-Reportergen-Assays zur Analyse der 3'UTR des *IL1RAP*-Gens im Hinblick auf eine gemeinsame regulatorische Wirkung der miR-155-5p und der miR-21-5p.

Auf Grundlage von nahegelegenen 3'UTR-Bindestellen wurde die gemeinsame regulatorische Wirkung der miR-155-5p und der miR-21-5p im Zusammenhang mit dem *IL1RAP*-Gen untersucht. Ein entsprechendes 3'UTR-Reporterplasmid-Konstrukt (**A**) wurde dazu mittels dualen Luciferase-Reportergen-Assays im humanen HEK293T-Zellsystem getestet (**B**). Dabei wurden die Überexpression der miR-155, der miR-21 oder beider miRNAs untersucht. Die Vermessung der Zellextrakte fand 48 h nach der Transfektion statt. Die Aktivität der Firefly-Luciferase wurde anhand der Aktivität der Renilla-Luciferase sowie der basalen Reporter-Aktivität normiert und die Ergebnisse in Relation zur jeweiligen Aktivität des leeren Reporterplasmids (pMIR-RNL-TK) gesetzt. Die relative Luciferase-Aktivität [%] ist als Mittelwert und mit Angabe des Standardfehlers (SEM) auf Grundlage von vier unabhängigen Untersuchungen dargestellt, die in technischen Duplikaten durchgeführt wurden. (p = p -Wert; $n.s.$ =Nicht signifikant)

Im Falle von *LEMD3* wurden nahegelegene 3'UTR-Bindestellen der miR-155-5p und miR-21-5p mit einer Distanz von 9 nt vorhergesagt (**Abbildung 31A**), welche somit ebenfalls dem Kriterium der Sequenznähe potenzieller kooperativer Bindestellen entsprachen (GRIMSON et al., 2007). Bei dem Genprodukt des *LEMD3*-Gens handelt es sich um einen Inhibitor des TGF-beta-Signalweges (LIN et al., 2005; PAN et al., 2005). Dieser ist von entscheidender Bedeutung für die T-Zell-Funktionalität, indem er zur Regulation von Prozessen wie der T-Zell-Teilung oder der Effektor-Zell-Differenzierung beiträgt (LI, FLAVELL, 2008; OH, LI, 2013). Für die zugehörige mRNA konnte nach 24 h eine Abnahme mit einem *Fold Decrease* von 2,00 (Spender 1; Median-Ergebnis) bzw. 2,01 (Spender 2; Median-Ergebnis) im Vergleich zum 0 h Zeitpunkt beobachtet werden.

Für die Analyse des miR-155-5p-Effektes war kein signifikanter Effekt im Zusammenhang mit der miRNA-Überexpression zu beobachten. Die zugehörige relative Luciferase-Aktivität lag im Vergleich zum leeren Reporterplasmid bei 109,9 % (SEM: $\pm 5,5$; $p=0,15$). Anhand einer Reduktion der relativen Luciferase-Aktivität im Zusammenhang mit der miR-21-5p (p -Werte $7,57 \times 10^{-6}$), konnte jedoch eine miRNA-Zielgen-Beziehung bestätigt werden (**Abbildung 31B**). Dabei lag die Luciferase-Aktivität des zugehörigen 3'UTR-Konstrukte im relativen Vergleich zum leeren Reporterplasmid bei 82,9 % (SEM: $\pm 1,6$). Im Zusammenhang mit der Überexpression beider miRNAs war im Falle der *LEMD3*-3'UTR zusätzlich eine signifikante Verstärkung des miR-21-5p-induzierten Effektes zu verzeichnen ($p=4,85 \times 10^{-6}$). Die zugehörige relative Luciferase-Aktivität lag bei 70,4 % (SEM: $\pm 2,7$; $p=2,20 \times 10^{-3}$).

Anhand der Testung der *LEMD3*-3'UTR konnte somit eine synergistische Zielgen-Regulation durch die gemeinsame Expression der miR-155-5p und der miR-21-5p bestätigt werden.

4. Ergebnisse

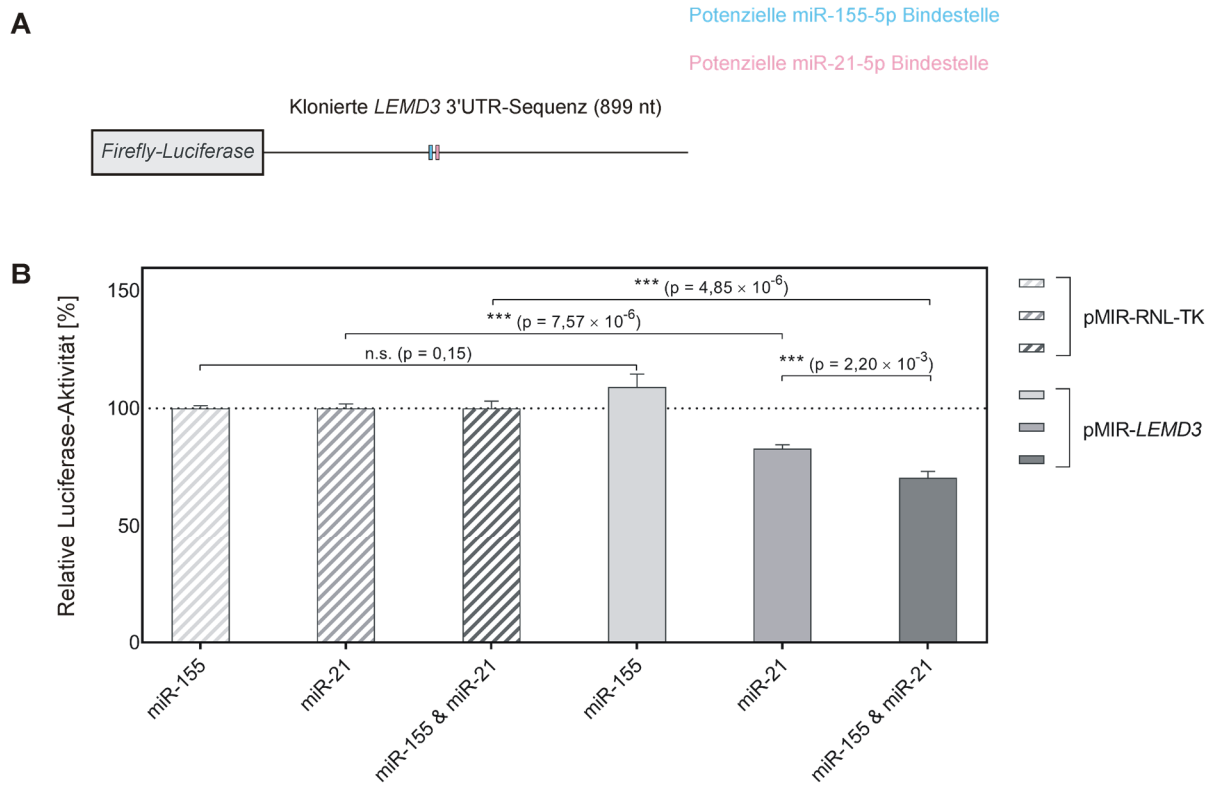


Abbildung 31: Duale Luciferase-Reportergen-Assays zur Analyse der 3'UTR des *LEMD3*-Gens im Hinblick auf eine gemeinsame regulatorische Wirkung der miR-155-5p und der miR-21-5p.

Auf Grundlage von nahegelegenen 3'UTR-Bindestellen wurde die gemeinsame regulatorische Wirkung der miR-155-5p und der miR-21-5p im Zusammenhang mit dem *LEMD3*-Gen untersucht. Ein entsprechendes 3'UTR-Reporterplasmid-Konstrukt (**A**) wurde dazu mittels dualen Luciferase-Reportergen-Assays im humanen HEK293T-Zellsystem getestet (**B**). Dabei wurden die Überexpression der miR-155, der miR-21 oder beider miRNAs untersucht. Die Vermessung der Zellextrakte fand 48 h nach der Transfektion statt. Die Aktivität der Firefly-Luciferase wurde anhand der Aktivität der Renilla-Luciferase sowie der basalen Reporter-Aktivität normiert und die Ergebnisse in Relation zur jeweiligen Aktivität des leeren Reporterplasmids (pMIR-RNL-TK) gesetzt. Die relative Luciferase-Aktivität [%] ist als Mittelwert und mit Angabe des Standardfehlers (SEM) auf Grundlage von vier unabhängigen Untersuchungen dargestellt, die in technischen Duplikaten durchgeführt wurden. (p = p -Wert; $n.s.$ =Nicht signifikant)

4.9. Spezifizierung der quantitativen miR-155-5p-Expressionsdaten

Im Zusammenhang mit der Entwicklung von innovativen Therapieansätzen könnten synthetische miRNAs für die gezielte Manipulation von Zell-Funktionen genutzt werden (GIRI et al., 2019; JI et al., 2016; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017). Eine Überdosierung könnte im Rahmen einer therapeutischen microRNA-Nutzung jedoch zu toxischen Nebeneffekten führen (LAI et al., 2019; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017). Aufgrund der oben beschriebenen ausgeprägten und reproduzierbaren Expressionsveränderung sowie den mit der Literatur übereinstimmenden Hinweisen auf eine zentrale regulatorische Funktion (RODRIGUEZ et al., 2007), wurde die miR-155-5p ausgewählt, um die quantitative Auswertung der zugehörigen Expressionsdaten nochmals genauer zu spezifizieren und somit im Hinblick auf die Therapie-Entwicklung möglichst präzise Informationen zur physiologischen miRNA-Expression zu erlangen.

Dazu wurde die, im Rahmen der Microarray-Eichung ermittelte, spezifische Eichkurve (vergleiche Kapitel 4.6.2. Absolute Quantifizierung der miRNA-Expression“ und **Abbildung 32A**; $R^2=0,9994$) für die Analyse der absoluten miR-155-5p-Expression genutzt. Zudem wurden extrapolierende Berechnungsschritte, wie beispielsweise die Kalkulation der Molekülzahl pro Zelle unter der Voraussetzung einer konstanten Zellanzahl, ausgelassen. Die quantitative Bestimmung der miR-155-5p-Expression wurde dementsprechend auf die detektierte Menge in den einzelnen Array-Reaktionen, das heißt auf konstante zelluläre RNA-Mengen von jeweils 75 ng, bezogen. Zur vereinfachten Übersicht wurden die resultierenden Daten als Gesamtergebnis für beide Spender ausgewertet (n=6 pro Zeitpunkt).

Bei der Analyse von jeweils 75 ng der zellulären Gesamt-RNA lag die quantifizierte Expressionsmenge der miR-155-5p im Bereich zwischen 9,36 amol (2 h; Minimum) und 404,50 amol (24 h; Maximum) (**Abbildung 32B**). Der maximale Rahmen der miR-155-5p-Expressionsänderung betrug somit 395,11 amol.

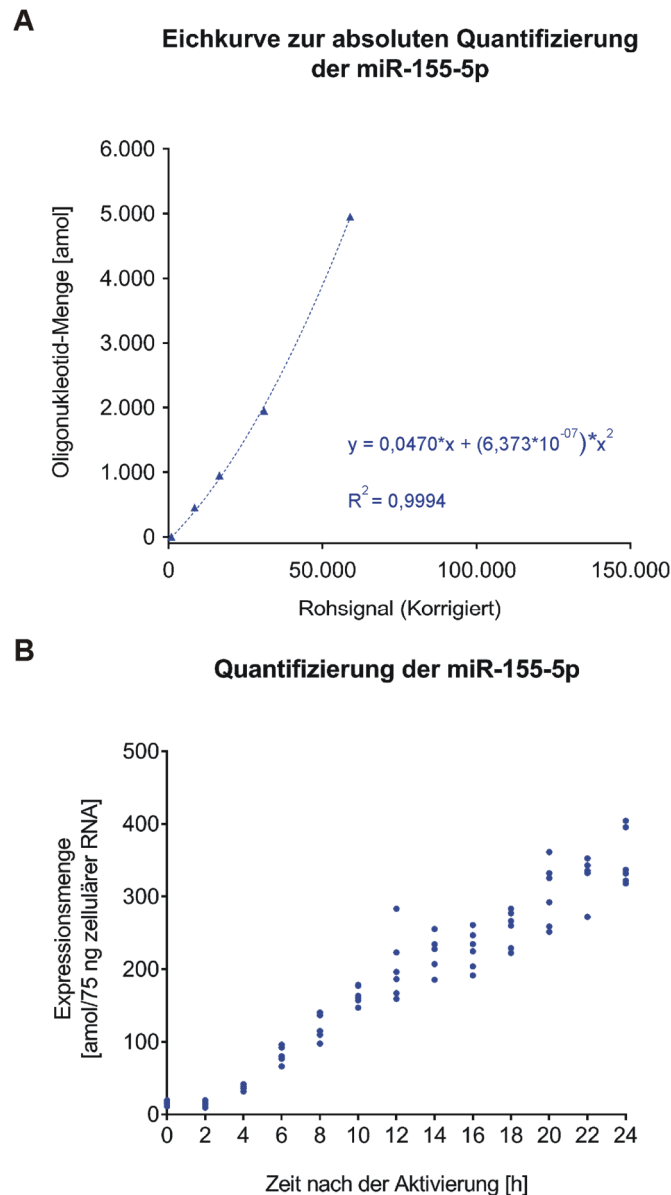


Abbildung 32: Spezifische Quantifizierung der miR-155-5p-Expression mit Bezug zur analysierten Gesamt-Menge der zellulären RNA.

- A)** Die Eichkurve zur absoluten Quantifizierung der miR-155-5p, welche für das verwendete Microarray-Analysesystem mithilfe von Oligonukleotid-*spike-ins* und vor dem Hintergrund einer nicht-kompetitiven RNA-Probe (MS2-Bakteriophagen-RNA) erstellt wurde, ist mit Angabe der Kurvengleichung sowie dem zugehörigen Bestimmtheitsmaß (R^2) angegeben.
- B)** Im Zusammenhang mit den Zeitverlaufsanalysen der T-Zell-Aktivierung wurde die molekulare Expression der miR-155-5p mit Bezug zur analysierten Gesamt-Menge der zellulären RNA quantitativ erfasst. Pro Microarray-Analysereaktion wurden dabei 75 ng zelluläre RNA verwendet. Die Ergebnisse der Quantifizierung [amol/75 ng zellulärer RNA] wurden gemeinsam für beide Spender (Spender 1 und 2), das heißt auf Grundlage von insgesamt sechs Proben pro Zeitpunkt (dargestellt als Punkte), ausgewertet.

4. Ergebnisse

Unter Einbezug der Avogadro-Konstanten (N_A : [Teilchen (Moleküle)/mol]) wurde die enthaltene Molekülanzahl auf Grundlage der quantifizierten Expressionsmengen bestimmt. Dabei lag die resultierende molekulare Expressionsmenge der miR-155-5p im Bereich zwischen $5,65 \times 10^6$ (entsprechend 9,36 amol; bei 75 ng zellulärer Gesamt-RNA) und $2,44 \times 10^8$ Molekülen (entsprechend 404,50 amol; bei 75 ng zellulärer Gesamt-RNA). Pro Nanogramm der zellulären RNA entsprach dies somit einer minimalen Expressionsmenge von $7,54 \times 10^4$ und einer maximalen Menge von $3,25 \times 10^6$ Molekülen. Der maximale Rahmen der miR-155-5p-Expressionsänderung lag bei $2,38 \times 10^8$ Molekülen (entsprechend 395,11 amol; bei 75 ng zellulärer Gesamt-RNA). Dies entsprach einer maximalen Expressionsänderung von $3,17 \times 10^6$ Molekülen pro Nanogramm der zellulären RNA.

Unter Einbezug des Molekulargewichtes der reifen miR-155-5p, wurde zudem die zugehörige Masse der quantifizierten Expressionsmengen berechnet. Zur Berechnung wurde das Molekulargewicht des miR-155-5p-RNA-Oligonukleotids herangezogen, welches als *spike-in* bei der Microarray-Eichung diente. Auf Grundlage der massenspektrometrischen Analysedaten des Herstellers (vergleiche Material und Methodenteil) lag dieses bei etwa 7.696 g/mol ($=7,696 \times 10^6$ ng/amol). Bei der Analyse von jeweils 75 ng der zellulären Gesamt-RNA lag dementsprechend der Massenanteil der miR-155-5p im Bereich zwischen $7,23 \times 10^{-5}$ ng (entsprechend 9,36 amol) und $3,11 \times 10^{-3}$ ng (entsprechend 404,50 amol). Das abgeleitete zellphysiologische Mengenverhältnis zwischen der miR-155-5p und der Gesamt-RNA konnte damit auf einen Bereich zwischen eins zu 1×10^6 und eins zu 2×10^4 beziffert werden. Die maximale miR-155-5p-Expressionsänderung lag bei $3,04 \times 10^{-3}$ ng (entsprechend 395,11 amol). Dies entsprach einer maximalen Expressionsänderung von 0,04 pg pro Nanogramm der zellulären RNA.

Ausgehend von einer durchschnittlichen T-zellulären Gesamt-RNA-Menge von etwa einem Pikogramm pro Zelle (WANG et al., 2019; ZHENG et al., 2017), könnte auf Grundlage der hier beschriebenen quantitativen Daten der miR-155-5p eine zellulär eingebrachte synthetische miRNA-Menge von etwa 0,395 amol pro Zelle als Ausgangspunkt für die Entwicklung einer zellphysiologisch angepassten Transfektionsdosierung dienen. Die weiterhin beschriebenen quantitativen Parameter der miR-155-5p (miRNA-Moleküle, und Molekulargewichtsanteil) sowie die im Kapitel 4.7 beschriebenen quantitativen miRNA-Expressionsdaten könnten mit Bezug zur (zelltypspezifischen) Gesamt-RNA-Menge (ISLAM et al., 2011; SASAGAWA et al., 2013) weitere Grundinformationen für die Etablierung von therapeutischen miRNA-Dosierungen liefern.

5. Diskussion

MiRNAs spielen eine Schlüsselrolle für die Regulation der T-Zell-Aktivität (EICHMULLER et al., 2017; KOPP et al., 2013; LIU et al., 2013b; LORENZI et al., 2012). Als Biomarker für T-Zell gekoppelte Erkrankungen und als Instrument für die gezielte Manipulation der T-Zell-Funktion könnten sie künftig zum Bestandteil von diagnostischen und immuntherapeutischen Ansätzen werden (COLAMATTEO et al., 2019; LONG et al., 2018). Umfangreiche Kenntnisse zur Expression und Funktion von miRNAs sind dafür eine wesentliche Voraussetzung (EICHMULLER et al., 2017; GIRI et al., 2019; JI et al., 2016; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017). Die Ziele dieser Arbeit bestanden in der Erfassung, Quantifizierung und funktionellen Charakterisierung von miRNA-Expressionsveränderungen im frühen 24 h Zeitraum der humanen T-Zell-Aktivierung. Aufgrund der Vielfältigkeit der Analysen werden in der folgenden Diskussion primär die methodischen Aspekte der Expressionsanalysen, die Koordinierung und Funktion der miRNAs sowie die mögliche Nutzung der gewonnenen miRNA-Expressionsinformationen thematisiert.

5.1. Evaluierung der miRNA-Expressionsanalysen

5.1.1. Analyse von zeitaufgelösten miRNA-Expressionsprofilen mithilfe des Microarray-Verfahrens

Zur Erfassung der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsprofile wurde der Expressionsnachweis auf Grundlage des Microarray-Hoch-Durchsatz-Verfahrens durchgeführt. Im Folgenden soll eine Evaluierung der Microarray-Expressionsanalysen im Vergleich zu anderen miRNA-Detektionmethoden vorgenommen werden.

Für das Design der miRNA-spezifischen Sonden greift das hier verwendete Microarray-System auf die neuesten Sequenzinformationen der miRNA-Datenbank (miRBase) zurück (D'ANDRADE, FULMER-SMENTEK, 2012; KOZOMARA, GRIFFITHS-JONES, 2014). Nach Angaben des Herstellers (Agilent Technologies Inc.) wurden im konkreten Falle die Sequenzinformationen der miRBase Version 21 für das Design der Sonden-Chips herangezogen (AGILENT TECHNOLOGIES INC.; KOZOMARA et al., 2019; KOZOMARA, GRIFFITHS-JONES, 2014).

Die ersten miRNAs wurden mithilfe von *forward genetics* Methoden oder im Rahmen von klassischen Sanger-Sequenzierungsanalysen entdeckt. In der Regel fand dabei neben der Erfassung der miRNAs eine experimentelle Validierung statt, indem die zugehörigen

Sequenzen kloniert und die zelluläre miRNA-Expression experimentell nachgewiesen wurde (HUANG et al., 2011; LUDWIG et al., 2017). Durch die fortschreitende Entwicklung von Hoch-Durchsatz-Sequenzierungs-Technologien (*Small RNA sequencing (Small RNA-Seq technologies)*) wurden in neuerer Zeit jedoch tausende neuer Sequenzen identifiziert, die auf Grundlage von bioinformatischen Vorhersagemodellen miRNAs darstellen könnten (KOZOMARA, GRIFFITHS-JONES, 2014; LIU et al., 2014; LUDWIG et al., 2017). In den neueren Versionen der miRBase werden diese als „annotierte“ miRNAs zumeist schon vor der experimentellen Validierung hinterlegt (ALLES et al., 2019; KOZOMARA et al., 2019; LUDWIG et al., 2017). Durch die systematische Auswertung von miRNA-Sequenzierungsdaten und die experimentelle Überprüfung von annotierten miRNAs gibt es jedoch Hinweise, dass viele der so hinterlegten Sequenzen definitionsgemäß keine echten miRNAs darstellen (ALLES et al., 2019; CHIANG et al., 2010; KOZOMARA et al., 2019). Dementsprechend könnte es sich bei einigen der hier beschriebenen Sequenzen um RNA-Spezies handeln, die fälschlich als miRNAs ausgewiesen sind (ALLES et al., 2019; BROWN et al., 2013; CHIANG et al., 2010). Ein entsprechendes Beispiel stellt die miR-1273g dar. Diese war zu Beginn dieser Expressionsstudie noch als miRNA der miR-1273-Familie in der miRBase hinterlegt, wurde jedoch bei einer Aktualisierung im Verlauf dieser Arbeit als „falsch-annotiert“ aus der neueren Datenbankversion (Version 22) entfernt (KOZOMARA et al., 2019). Diese generellen Defizite der miRNA-Sequenz-Datenbank wirken sich auch auf alternative Detektionsverfahren, wie die RT-qPCR oder die Hoch-Durchsatz-Sequenzierung (*Small RNA sequencing, Small RNA-Seq*), aus. Dabei können inkorrekte miRBase-Informationen beispielsweise zu Fehlern bei der Auswahl von miRNA-spezifischen Primern und Sonden oder zu einer fehlerhaften Zuordnung der Sequenzierungsdaten führen (CHUGH, DITTMER, 2012; ZHONG et al., 2019; ZIEMANN et al., 2016).

MiRNAs können auf Basis von Sequenzhomologien in bestimmte miRNA-Familien eingeteilt werden (KACZKOWSKI et al., 2009; KOZOMARA et al., 2019). Bei der Unterscheidung von miRNAs mit ähnlicher Sequenz kann es im Zusammenhang mit der Sonden-Hybridisierung des Microarray-Detektionsverfahrens zur Unschärfe kommen (GIT et al., 2010; LESHKOWITZ et al., 2013; YE et al., 2019). Entsprechende Sequenzähnlichkeiten können jedoch auch bei anderen Detektionsverfahren zu Ungenauigkeiten führen (ANDROVIC et al., 2017; DE HOON et al., 2010; LESHKOWITZ et al., 2013). So kann es bei Sequenzierungsanalysen durch Sequenzhomologien unter Umständen zu einer fehlerhaften Zuordnung der detektierten Sequenzabschnitte kommen (DE HOON et al., 2010). Zudem können durch enzymatische Amplifikationsschritte Sequenzveränderungen eingefügt werden und beim Vergleich zwischen sequenziell ähnlichen miRNAs zu Fehlinterpretationen führen (LESHKOWITZ et al., 2013).

Durch Limitierungen bei der Primer-Spezifität sind auch im Rahmen von RT-qPCR-Analysen Ungenauigkeiten bei der Unterscheidung zwischen sequenzähnlichen miRNAs möglich (ANDROVIC et al., 2017).

Die gezielte Sequenz-Veränderung, das sogenannte miRNA-*Editing*, ist ein biologischer Mechanismus zur Modulation der miRNA-Aktivität (CORREIA DE SOUSA et al., 2019). Diese Veränderungen werden meist innerhalb der *seed*-Region vorgenommen, so dass das Zielgen-Spektrum der betreffenden miRNA dynamisch verändert werden kann (CORREIA DE SOUSA et al., 2019; WARNEFORS et al., 2014). Microarray-Detektionssysteme sind jedoch in der Regel für die Erfassung von kanonischen miRNA-Sequenzen ausgelegt (GIT et al., 2010; LESHKOWITZ et al., 2013). Des Weiteren können miRNAs eine Zelltyp- oder Kontext-spezifische Expression aufweisen (HE et al., 2012; JUZENAS et al., 2017). Demnach könnten auch noch unbekannte miRNAs mit relevanter Funktion im Rahmen des T-Zell-Aktivierungsprozesses existieren, die noch nicht in der miRBase hinterlegt sind und damit nicht durch die verwendeten Microarray-Sonden detektiert werden können (SIDDIKA, HEINEMANN, 2020). Somit ergeben sich Einschränkungen für den Sonden basierten Expressionsnachweis durch die fehlenden Detektionsmöglichkeiten für miRNA-Isoformen und für neue miRNAs (LESHKOWITZ et al., 2013; SIDDIKA, HEINEMANN, 2020). Vergleichbares gilt in der Regel auch für den Primer-abhängigen Expressionsnachweise mittels RT-qPCR (ANDROVIC et al., 2017).

Für einen ausgeweiteten miRNA-Sequenznachweis können als Fortführung der Microarray basierten Untersuchungen daher Zeitverlaufsstudien mit anschließender Sequenzierungsanalyse durchgeführt werden (CHUGH, DITTMER, 2012; MARINOV et al., 2014; RODRIGUEZ-GALAN et al., 2021). Ein entsprechender Untersuchungsansatz konnte aktuell zeigen, dass eine Editierung des 3'-Sequenzendes (3'-Adenylierung) der Stabilisierung von bestimmten miRNAs im Rahmen der frühen CD4+-T-Zell-Aktivierung dienen könnte (RODRIGUEZ-GALAN et al., 2021). Gleichzeitig bestätigen die Ergebnisse der beschriebenen Sequenzierungsstudie die Microarray-Daten dieser Arbeit durch eine Vielzahl an Übereinstimmungen bei der Detektion von aktivierungs-gekoppelten microRNA-Expressionsveränderungen (RODRIGUEZ-GALAN et al., 2021).

5.1.2. Eichung des Microarray-Analysesystems zur quantitativen Auswertung der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten

Um quantitative Informationen zu den detektierten miRNA-Expressionsveränderungen abzuleiten, wurden mithilfe von synthetischen miRNA *spike-ins* Eichkurven für das verwendete Microarray-Analysesystem erstellt.

Im Gegensatz zu Untersuchungen mit Sequenzierungstechniken oder mit quantitativen PCR-Methoden, werden Microarray basierte Analysen in der Regel nicht für die quantitative Erfassung der RNA-Expression verwendet. Als Gründe werden unter anderem Mängel bei der technischen Reproduzierbarkeit und der experimentellen Genauigkeit genannt (CANALES et al., 2006; DRAGHICI et al., 2006; FU et al., 2009; T HOEN et al., 2008). Viele dieser Befunde basieren allerdings auf der Detektion von mRNAs (BISSELS et al., 2009; FU et al., 2009). Bei miRNA-Expressionsanalysen konnte im Vergleich zu anderen Detektionsverfahren für einige Microarray-Analysesysteme eine äquivalente oder gar eine verbesserte Leistungsfähigkeit belegt werden (GIT et al., 2010; SAH et al., 2010; WILLENBROCK et al., 2009). So konnte in methodischen Vergleichsanalysen für das Untersuchungssystem der Firma Agilent Technologies eine hohe Reproduzierbarkeit und hohe miRNA-Detektionsgenauigkeit bestätigt werden (LESHKOWITZ et al., 2013). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass in Microarray-Analysesystemen eine quantitative miRNA-Expressionserfassung durch den Vergleich mit synthetischen Oligonukleotid-Referenzen möglich ist (BISSELS et al., 2009).

Auch für die miRNA-Zeitverlaufsdaten der vorliegenden Arbeit kann von einer hohen Zuverlässigkeit der Microarray basierten Expressionsanalysen ausgegangen werden. Vergleichbare Zeitverlaufsmuster bei der Untersuchung von technischen und biologischen Replikaten weisen auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Microarray-Daten hin. Übereinstimmende Ergebnisse zwischen den Microarray-Untersuchungen und dem Taqman-RT-qPCR-Verfahren, welches als zuverlässige Methode für die quantitative Erfassung der miRNA-Expression gilt (CHEN et al., 2005; SVEC et al., 2015), sprechen zudem für eine gleichwertige Genauigkeit bei der quantitativen Beschreibung von miRNA-Expressionsprofilen.

Wie auch bei anderen quantitativen Analysemethoden (CHUGH, DITTMER, 2012; WRIGHT et al., 2019), ist bei der Bewertung der Microarray basierten Quantifizierungsmethodik die Möglichkeit von methodisch bedingten Varianzen zu beachten. So können Unterschiede zwischen den jeweiligen miRNA-Sequenzen im Rahmen von Microarray-Untersuchungen zu einer variablen Effizienz der Fluoreszenzmarkierung und der Sonden-Hybridisierung führen (BISSELS et al., 2009; LESHKOWITZ et al., 2013). Entsprechende miRNA-spezifische Detektionssignal-Verschiebungen wurden auch für das verwendete Analysesystem beschrieben (LESHKOWITZ et al., 2013). Frühere Studien lassen dementsprechend vermuten, dass die Verwendung einer universellen Eichkurve negativen Einfluss auf die Genauigkeit von Microarray basierten Quantifizierungsdaten haben könnte (BISSELS et al., 2009). Eine entsprechende Kurve wurde in dieser Arbeit als Durchschnittsergebnis von verschiedenen miRNA-Oligonukleotid *spike-ins* ermittelt und wurde für die simultane Quantifizierung aller detektierter miRNAs verwendet. In Übereinstimmung mit der oben beschriebenen Vermutung, wiesen die Ergebnisse der experimentellen Testung zur Übertragbarkeit der entsprechenden Eichkurve für die Quantifizierung von verschiedenen miRNAs auf eine unterschiedliche Genauigkeit hin. Im Durchschnittsergebnis zeigte die experimentelle Testung der universellen Eichkurve jedoch eine gute quantitative Leistung.

Die quantitativen miRNA-Expressionsdaten wurden mithilfe der Eichkurve und mit stabilem Bezug zur analysierten Gesamt-RNA-Menge bestimmt. Im Rahmen der quantitativen Auswertungen wurde zusätzlich die Anzahl der miRNA-Moleküle pro Zelle unter Berücksichtigung der extrahierten Gesamt-RNA-Mengen und unter der Voraussetzung einer konstanten Zellanzahl extrapoliert. Hierbei könnte eine Minderung der Quantifizierungsgenauigkeit als Folge einer Veränderung der Zellanzahl aufgetreten sein, zum Beispiel durch die vorzeitige Teilung oder das Absterben einzelner Zellen. Da entsprechende Berechnungsschritte jedoch unter gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt wurden, sollte die allgemeine Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen der quantifizierten miRNAs dennoch gewährleistet sein.

Die Ergebnisse zur zellulären miRNA-Expression stehen zudem im Einklang mit den Daten früherer Literatur. Zelluläre miRNA-Expressionsmengen wurden in vorangegangenen Hoch-Durchsatz-Studien im Zusammenhang mit verschiedenen humanen Zellkulturmodellen beschrieben. Die Expressionsmengen wurden dabei anhand von Richtwerten oder auf Grundlage von Voruntersuchungen zur zellulären Gesamt-RNA-Menge eingeschätzt (JANAS et al., 2012; SONG et al., 2017). Auf Basis dieser Analysen wird ein Expressionsbereich zwischen circa 10^3 und 10^5 Molekülen pro Zelle für hoch exprimierte miRNAs angenommen (JANAS et al., 2012; SONG et al., 2017). Dies entspricht dem Mengenbereich, welcher im Rahmen dieser Arbeit für die am stärksten exprimierten miRNAs quantifiziert wurde.

Untersuchungen an humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen weisen für miRNAs, die bei der Analyse unterschiedlicher Probanden vergleichbare Expressionsprofile zeigten, auf einen Expressionsrahmen zwischen etwa 10 und 10^3 Molekülen pro Zelle hin (BISSELS et al., 2009). Diese Befunde stehen ebenfalls in Übereinstimmung mit den zellulär quantifizierten Expressionsmengen der 39 miRNAs, welche im Zusammenhang mit dieser Arbeit als mögliche interindividuell konservierte Regulatoren des T-Zell-Aktivierungsprozesses identifiziert wurden. Trotz möglicher miRNA-spezifischer Einschränkungen scheint anhand der globalen quantitativen Expressionsanalysen somit eine grundlegende Einschätzung der molekularen miRNA-Expression möglich zu sein.

Für die spezifizierten miR-155-5p-Quantifizierungsdaten ist zudem von einer zusätzlich verbesserten Genauigkeit auszugehen, da, im Gegensatz zu universellen Eichkurven, bei miRNA-spezifischen Eichkurven sequenzabhängige Signalverschiebungen berücksichtigt werden können (BISSELS et al., 2009).

Als Fazit sollten die vorliegenden quantitativen Auswertungen insgesamt eine realistische Einschätzung der molekularen miRNA-Expression und Rückschlüsse über das molekulare Ausmaß von miRNA-Expressionsveränderungen im Zusammenhang mit dem zeitlichen Verlauf der T-Zell-Aktivierung ermöglichen.

5.1.3. Vergleichende Expressionsanalysen zur Identifizierung von zentralen miRNAs

Die initialen 24-Stunden der T-Zell-Aktivierung sind von funktionellen und transkriptionellen Veränderungen geprägt (HESS et al., 2004; ULLMAN et al., 1990). Für die zielgerichtete Regulation von zellulären Signalprozessen, kann die miRNA-Expression zellulär adaptiert werden (AVRAHAM, YARDEN, 2012; GULYAEVA, KUSHLINSKIY, 2016). Die im Rahmen dieser Arbeit detektierten miRNA-Expressionsveränderungen dienten dazu, zentrale miRNAs im Zusammenhang mit dem T-Zell-Aktivierungsprozess zu identifizieren.

Durch die Auswertung der Quantil-normierten und \log_2 -skalierten Microarray-Expressionsdaten konnten 39 miRNAs mit deutlicher Expressionsveränderung im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses identifiziert werden. Die hohe Reproduzierbarkeit konnte dabei durch die Vergleichbarkeit der Expressionsdaten zwischen den beiden untersuchten Spendern sowie zwischen den jeweils drei technisch-replizierten Zeitverlaufsreihen pro Spender belegt werden. Durch Kontrolluntersuchungen von vier weiteren Spendern mit einer unabhängigen Methode (Taqman-Analysen) konnten die Zeitverlaufsmuster zudem für acht exemplarische miRNAs validiert werden. Bei den identifizierten miRNAs handelt es sich daher wahrscheinlich um adaptive Regulatoren der initialen T-Zell-Aktivierungsphase.

Für einige dieser miRNAs wurden in vorangegangenen Untersuchungen sowie in einer kürzlich erschienen Sequenzierungsstudie vergleichbare Expressionsänderungen im Zusammenhang mit der humanen T-Zell-Aktivierung beschrieben (GRIGORYEV et al., 2011; RODRIGUEZ-GALAN et al., 2021; RODRIGUEZ-GALAN et al., 2018). So zeigen beispielsweise die miR-17-5p, miR-18a-5p, miR-19a-3p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-132-3p, miR-155-5p sowie die miR-221-3p nach 48-stündiger Aktivierung einen deutlichen und interindividuell reproduzierbaren Expressionsanstieg und die miR-26a-5p, miR-125b-5p, miR-181a-5p sowie die miR-223-3p eine entsprechende Expressionsreduktion (GRIGORYEV et al., 2011). Studien an Mäusen bestätigen zudem die beschriebenen Expressionsveränderungen für weitere miRNAs (CHO et al., 2016; GAGNON et al., 2019; RODRIGUEZ-GALAN et al., 2018). Vorangegangene Studien bestätigen somit die Befunde dieser Arbeit und geben einen Hinweis auf die zeitliche Stabilität der hier beschriebenen miRNA-Expressionsveränderungen.

Eine weitere Informationsquelle können die Daten der quantitativen miRNA-Expressionsanalysen bieten. Unter Einbezug der molekularen Expressionsdaten können dabei die detektierten Expressionsveränderungen spezifiziert und weitere Kandidaten zur Liste der miRNAs mit möglicher zentraler Funktionalität hinzugefügt werden. Verschiedenste Expressionsstudien weisen auf einen Zusammenhang zwischen der miRNA-Expressionsmenge und der regulatorischen miRNA-Wirkung hin (BROWN et al., 2007; MAYYA, DUCHAINE, 2015; MULLOKANDOV et al., 2012). Eine prägnante molekulare Expressionsveränderung nach T-Zell-Aktivierung, könnte somit einen breiten regulatorischen Einfluss der betreffenden miRNAs anzeigen. Auf Grundlage der Expressionsmenge könnten allerdings auch hoch-exprimierte miRNAs mit einem stabilen Expressionsverlauf zentrale Regulatoren der T-Zell-Funktion darstellen und dabei ein breites Zielgen-Spektrum regulieren (BROWN et al., 2007; MAYYA, DUCHAINE, 2015; MULLOKANDOV et al., 2012). Veränderte Transkriptionsraten von miRNA-Zielgenen könnten dazu unabhängig von der miRNA-Expression eine gezielte Verschiebung des miRNA-spezifischen Zielgen-Spektrums zwischen dem Ruhezustand und der Aktivierungsphase bewirken (ARVEY et al., 2010; JEKER, BLUESTONE, 2013; MULLOKANDOV et al., 2012; SMIGIELSKA-CZEPIEL et al., 2013).

Die regulatorische miRNA-Aktivität kann jedoch nicht allein anhand der jeweiligen miRNA-Expressionshöhe postuliert werden (CORREIA DE SOUSA et al., 2019). Auch die im Rahmen dieser Arbeit detektierten miRNAs mit vergleichsweise niedriger molekularer Expressionsmenge könnten an der Regulation des T-Zell-Aktivierungsprozesses beteiligt sein und Gene regulieren, die zentrale Schnittstellen innerhalb des T-Zell-Aktivierungsprozesses darstellen, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren (PODSHIVALOVA, SALOMON, 2013; SHU et al., 2017).

Mögliche Voraussetzungen könnte eine hohe Zielgen-Affinität und eine hohe funktionelle Spezifität der betreffenden miRNAs sein (BOSSON et al., 2014; DENZLER et al., 2016). Ein kleines Zielgen-Spektrum könnte dabei für eine hohe miRNA-zu-Zielgen-Ratio sorgen, bei der wenige miRNA-Moleküle für eine regulatorische Wirkung ausreichend wären (ARVEY et al., 2010; BOSSON et al., 2014; LEMUS-DIAZ et al., 2017). Im Zusammenhang mit der T-Zell-Aktivierung wurde zudem eine Verkürzung von Zielgen-3'UTR-Sequenzen beschrieben (MAYR, BARTEL, 2009). Dies könnte das regulatorische Potenzial bestimmter miRNAs sowohl auf positivem als auch auf negativem Wege beeinflussen (HOFFMAN et al., 2016b; MAYR, BARTEL, 2009; SANDBERG et al., 2008). Des Weiteren wäre es denkbar, dass kooperative miRNA-Wirkungen eine geringe molekulare Expression einzelner miRNAs kompensieren könnten (DENZLER et al., 2016; SHU et al., 2017).

Die Expressionsanalysen dieser Arbeit bieten somit eine umfassende Daten-Grundlage für die Auswahl von microRNAs, deren funktionelle Charakterisierung im Rahmen fortführender Studien weiteren Aufschluss über microRNA-regulierte Netzwerke im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses geben könnte.

5.1.4. Identifizierung von miRNA-Zielgenen unter Einbezug der mRNA-Expressionsdaten

Durch die Identifizierung von Zielgenen sollte die regulatorische Funktion von miRNAs im Zusammenhang mit dem T-Zell-Aktivierungsprozess genauer charakterisiert werden.

Für die Vorauswahl der potenziellen miRNA-Zielgene wurde in einem ersten Schritt eine *in silico* Vorhersage durchgeführt. MiRNA-Bindestellen sind überwiegend in den 3'UTR-Sequenzen ihrer Ziel-mRNAs lokalisiert (GREGORY et al., 2005; NAKANISHI, 2016). Die miRNA-Zielgen-Interaktion wird dabei über die *seed*-Region der miRNA vermittelt (FRIEDMAN et al., 2009; GARZON et al., 2009; GRIMSON et al., 2007). Zur Zielgen-Vorhersage wird in genomweiten 3'UTR-Referenzdaten nach Sequenzmotiven gesucht, die eine (partielle) reverse Komplementarität zur miRNA-spezifischen *seed*-Sequenz und den umliegenden Nukleotiden aufweisen (ROJO ARIAS, BUSSKAMP, 2019; WITKOS et al., 2011). Darüber hinaus können weitere Faktoren, wie beispielsweise die Sekundärstrukturen der umliegenden 3'UTR-Sequenzregion oder zusätzliche Basenpaarbindungen außerhalb der *seed*-Region, von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität der Bindestellen sein (KERTESZ et al., 2007; MARIN, VANICEK, 2011; SHEU-GRUTTADAURIA et al., 2019b). Wegen der Komplexität der Parameter, welche zu einer funktionellen miRNA-Zielgen-Interaktion beitragen, besitzen unterschiedliche Algorithmen eine unterschiedliche Vorhersagegenauigkeit für potenzielle miRNA-Zielgene (KERN et al., 2020; RIOLO et al., 2020). Im Rahmen dieser Arbeit wurden potenzielle 3'UTR-miRNA-Bindestellen mithilfe des *miRWalk-Tools* postuliert, das die Vorhersagekraft von mehreren Algorithmen vereint (DWEET, GRETZ, 2015; DWEET et al., 2011).

Zur post-transkriptionellen Regulation von proteinkodierenden Genen induzieren miRNAs häufig eine Destabilisierung oder den Abbau ihrer Ziel-mRNAs (BAUMJOHANN, ANSEL, 2013; GUO et al., 2010; WINTER et al., 2009). Die mRNA-Expression kann somit einen weiteren Hinweis auf mögliche miRNA-Zielgen-Beziehungen liefern (NAIFANG et al., 2013; NAM et al., 2009; OH et al., 2017). Als ergänzendes Kriterium zur *in silico* Vorhersage fand die Auswahl der zu testenden Gene daher unter Einbezug der mRNA-Zeitverlaufsdaten statt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die regulatorische Funktion der miR-155-5p durch die Identifizierung von multiplen Zielgenen spezifiziert. Dabei wurde auf Basis der Zeitverlaufsanalysen ein inverses Korrelationsverhältnis zwischen der miR-155-5p-Expression und den jeweiligen mRNA-Zeitverlaufsdaten vorausgesetzt.

Bei einer vergleichbaren Microarray basierten Zeitverlaufsstudie wurde unter dem Stimulus einer medikamentösen Exposition von Multiplen-Myelom-Zellen eine zeitliche Verzögerung zwischen der miRNA-Expression und den Expressionsveränderungen der Ziel-mRNAs als Voraussetzung für die expressionsgekoppelte Zielgen-Identifizierung definiert (JAYASWAL et al., 2009). Im Gegensatz zu anderen Plattformen ist mithilfe des hier verwendeten Microarray-Systems allerdings eine effektive Unterscheidung zwischen den miRNA-Vorläuferformen und der reifen miRNA möglich (LESHKOWITZ et al., 2013). Somit sollte die Microarray-Detektion primär die Expressionsmengen der prozessierten, reifen miRNAs widerspiegeln, die zum gegebenen Zeitpunkt bereits aktiv an der Regulation der Zielgene beteiligt sein könnten. Experimentelle Untersuchungen an humanen T-Zellen belegen zudem, dass unter dem Einfluss des Aktivierungsprozesses ein großer Teil der mRNA-Transkripte erhöhte Abbauraten und vergleichsweise kurze Halbwertszeiten aufweist (KHABAR, 2007; RAGHAVAN et al., 2002). Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit die zeitliche Verschiebung zwischen der detektierten miRNA-Expression und der gekoppelten Wirkung auf die mRNA-Expression nicht berücksichtigt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass zeitliche Verschiebungseffekte auch im Rahmen der miR-155-5p-Funktion eine Rolle spielen könnten.

Die postulierten miRNA-Zielgen-Beziehungen wurden experimentell mithilfe von dualen Luciferase-Assays überprüft. Anhand einer Validierungsrate von 89,47 % kann auf Basis der miR-155-5p-Zielgen-Testungen bestätigt werden, dass mit der gewählten methodischen Vorgehensweise eine effektive Vorhersage von miRNA-Zielgen-Beziehungen möglich ist. In Bezug auf Zielgenvorhersage ist jedoch zu beachten, dass das Zielgen-Spektrum vom zellulären Kontext abhängen kann (ERHARD et al., 2014; HSIN et al., 2018). Analysen weisen darauf hin, dass miRNAs bei hoher Expression ein großes Zielgen-Spektrum regulieren können (BROWN et al., 2007; MAYYA, DUCHAINE, 2015; MULLOKANDOV et al., 2012). Es besteht somit die Möglichkeit, dass die Effizienz der Zielgenvorhersage unter anderem auf einen breiten regulatorischen Einfluss der prominent exprimierten miR-155-5p zurückzuführen ist. Es ist weiterhin zu beachten, dass die miRNA-basierte Regulation auch zur Inhibition des Translationsprozesses führen kann, ohne sich auf die mRNA-Ebene auszuwirken (BAUMJOHANN, ANSEL, 2013; O'BRIEN et al., 2018; WINTER et al., 2009).

Die inverse Korrelation und die positive Zielgen-Testung, sprechen grundsätzlich für einen kausalen Zusammenhang zwischen der miRNA-Expression und den zugehörigen Zeitverlaufsdaten der entsprechenden mRNAs. Fortführende Zeitverlaufsuntersuchungen könnten unter Einbezug der Protein-Ebene weiteren Aufschluss über die beschriebenen miRNA-Zielgen-Beziehungen liefern (HUANG et al., 2013a). Um miRNA-spezifische Regulationseffekte zuzuordnen, könnte in entsprechenden Versuchsreihen eine Manipulation durch miRNA-Inhibitoren oder synthetische miRNAs vorgenommen werden (CHRISTOPHER et al., 2016; KUHN et al., 2008). Da Proteine in der Regel längere Halbwertszeiten als mRNAs aufweisen (SCHWANHAUSSER et al., 2011), könnten miRNA-induzierten Effekte auf Protein-Ebene und somit auch auf funktioneller Ebene allerdings erst mit zeitlicher Verzögerung zum Tragen kommen (HUANG et al., 2013a; LEE et al., 2015a).

5.2. Koordinierung und Funktion von veränderten miRNAs

Detaillierte Informationen zur Koordinierung der miRNA-Expression, zur spezifischen Funktion und zur funktionellen Interaktion von miRNAs sind von entscheidender Bedeutung für ein grundlegendes Verständnis der Immunzellfunktion (GIRI et al., 2019; MEHTA, BALTIMORE, 2016). Anhand der vorliegenden Ergebnisse zur miRNA-Expressionsdynamik und zur Zielgen-Regulation sollen im Folgenden Rückschlüsse zur Koordinierung und Funktion von miRNA-Expressionsveränderungen im Zusammenhang mit der Regulation des frühen T-Zell-Aktivierungsprozesses gezogen werden.

5.2.1. Koordinierung der miRNA-Expressionsdynamik

Um die miRNA-Expressionsdynamik im Kontext mit der T-Zell-Aktivierung zu analysieren, wurden die zeitaufgelösten Expressionsmuster ausgewählter miRNAs mit deutlicher Expressionsveränderung untersucht. Die biologische und technische Reproduzierbarkeit der zugehörigen Zeitverlaufsdaten sowie das Auftreten von vergleichbaren Zeitverlaufsmustern zwischen unterschiedlichen miRNAs weisen dabei auf streng koordinierte Abläufe im Rahmen der miRNA-Expressionsregulation hin. Unter Einbeziehung der miRNA-Zeitverlaufprofile sollen im Folgenden verschiedene Rückschlüsse zu den Mechanismen gezogen werden, die im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses zur Koordinierung der miRNA-Expression beitragen könnten.

Die Transkription von miRNA-Genen kann über das Vorhandensein von bestimmten Transkriptionsfaktoren gesteuert werden (MARBACH-BAR et al., 2013; SCHANEN, LI, 2011). Transkriptionsfaktor gesteuerte Mechanismen tragen mit hoher Wahrscheinlichkeit auch zur koordinierten miRNA-Expression im Rahmen des T-Zell-Aktivierungsprozesses bei (PODSHIVALOVA, SALOMON, 2013). Anhand der *Cluster*-Analysen zeigen unter anderem die miR-15a-5p und die miR-15b-5p der miR-15-Familie (FINNERTY et al., 2010), die miR-30c-5p und miR-30e-3p der miR-30-Familie (MAO et al., 2018) sowie die miR-26a-5p ein ähnliches Zeitverlaufsmuster in Form einer kontinuierlichen und moderaten Expressionsabnahme. Im Gegensatz dazu weisen mehrere miRNAs der miR-17-Gen-Familie (miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a-5p, miR-20a-3p, miR-20a-5p; miR-18b-5p und miR-20b-5p) die durch das polycistronisch transkribierte miR-17-92-*Cluster* (*MIR17HG*, *miR-17-92a-1 cluster host gene* auf Chromosom 13) und das paraloge miR-106a-363-*Cluster* auf dem X-Chromosom kodiert sind (CONCEPCION et al., 2012; KOZOMARA et al., 2019; TAN et al., 2014), einen deutlichen Expressionsanstieg im Rahmen des Zeitverlaufs auf. Ein ähnlicher Expressionsanstieg mit vergleichbarem Verlauf zur miR-18b-5p, miR-20a-5p und miR-20b-5p konnte auch für die miR-21-5p nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit der T-Zell-Aktivierung kommt es bereits nach etwa zwei bis vier Stunden zu einer verstärkten mRNA- und Protein-Expression des c-Myc-Transkriptionsfaktors (auch als Myc bezeichnet) (LINDSTEN et al., 1988; MARCHINGO et al., 2020; WANG et al., 2011). Anhand der Analyse von verschiedenen humanen Zellsystemen gibt es Hinweise, dass dieser auf transkriptioneller Ebene die Expression zahlreicher miRNAs reguliert (CHANG et al., 2008; TAO et al., 2014). Dabei konnte sowohl eine negative expressionelle Regulation der miR-15a/miR-15b, miR-30e/miR-30c-1 und der miR-26a (CHANG et al., 2008; WILLIAMS et al., 2019) als auch eine positive expressionelle Regulation des miR-17-92- und miR-106a-363-*Clusters* sowie der miR-21 nachgewiesen werden (KUMAR et al., 2013; LI et al., 2021; O'DONNELL et al., 2005). Vor diesem Hintergrund könnte unter anderem die Regulation durch c-Myc im Rahmen der T-Zell-Aktivierung für die simultane transkriptionelle Koordinierung multipler miRNAs verantwortlich sein.

Zudem könnten Vernetzungen zwischen der Transkriptionsfaktor-gesteuerten miRNA-Expression und der miRNA-Funktion zur gezielten Modulation der miRNA-Expressionsdynamik beitragen. Für unterschiedliche Zelltypen konnten diverse Regelkreise zwischen c-Myc und den c-Myc-regulierten miRNAs nachgewiesen werden (JACKSTADT, HERMEKING, 2015). So scheint unter anderem eine auto-regulatorische Verbindung zwischen der c-Myc- und der miR-17-92-Expression zu bestehen (O'DONNELL et al., 2005; SYLVESTRE et al., 2007). Des Weiteren konnte c-Myc anhand von Luciferase-Reporter-Gen-Assays als ein Ziel der miR-155-5p identifiziert werden (SUN et al., 2014). Deren deutlicher Expressionsanstieg im Rahmen des Zeitverlaufs könnte mit der Transkriptionsfaktor-Regulation koordiniert sein. Dabei könnte auch der NFκB-Proteinkomplex eine Rolle spielen (THOMPSON et al., 2013), dessen Aktivität im Rahmen des T-Zell-Rezeptor-Signalweges nachweislich induziert wird (OH, GHOSH, 2013; THAKER et al., 2015) und bei dem es sich gleichzeitig um einen weiteren Regulator der miR-17-92-*Clusters* sowie der miR-21-Expression handeln könnte (SHIN et al., 2011; ZHOU et al., 2010).

In Bezug auf die Zeitverlaufsmuster und die resultierende Expressionsprofil-Klassen weisen die miRNAs des miR-17-92-*Clusters*, trotz einer gemeinsamen Transkriptionseinheit (CHAKRABORTY et al., 2012), teils deutliche Unterschiede auf. Einige der *Cluster* kodierten miRNAs entsprechen zudem nicht den Auswahlkriterien einer deutlichen und reproduzierbaren Expressionsveränderung und wurden dementsprechend nicht in die Expressionsprofil-Klassifizierung einbezogen. Die Unterschiede zwischen den Expressionsprofilen könnten durch eine unterschiedliche Prozessierung der miRNAs bedingt sein. Dabei scheint ein genereller Einfluss durch die Sekundär- und Tertiär-Struktur des polycistronischen miR-17-92-Transkriptes zu bestehen (CHAKRABORTY et al., 2012; CHAULK et al., 2011; FUZIWARA, KIMURA, 2015). Vergleichbares könnte auch für die miRNAs des paralogen miR-106a-363-*Clusters* gelten (MICHLEWSKI et al., 2008). Die Prozessierungseffizienz könnte zudem auch bei weiteren miRNAs durch die Struktur der Transkripte beeinflusst sein.

Darüber hinaus scheint sich auch die biologische Aktivität der miRNAs auf die Expressionsdynamik im Rahmen des T-Zell-Aktivierungsprozesses auswirken. Untersuchungen weisen darauf hin, dass die 5p- und 3p-Stränge eines gemeinsamen miRNA-Vorläufers für die Regulation eines unterschiedlichen Zielgen-Spektrums verantwortlich sein und somit separate zelluläre Funktionen erfüllen können (MEDLEY et al., 2021). Bei der Beladung des RISCs fungiert einer der Stränge präferenziell als biologisch aktiver Leitstrang, während der andere Einzelstrang freigesetzt und aufgrund einer fehlenden Protein-Stabilisierung degradiert wird (GUO, LU, 2010; MEIJER et al., 2014; WANG et al., 2009). Genomweite Expressionsstudien deuten für miRNA-Stränge mit geringerer biologischer Aktivität auf kürzere Halbwertszeiten hin (MARZI et al., 2016). Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Auswertung der miRNA-Expressionsdynamik. Als konkretes Beispiel für eine mögliche selektive Strang-Präferenz zeigen die 5p- und 3p-Stränge der miR-21 deutliche Unterschiede zwischen den zugehörigen Zeitverlaufsmustern. Im Falle des miR-21-3p-Stranges, welcher in der Regel als Strang mit geringerer biologischer Aktivität gilt (COUTINHO et al., 2007; KUMARSWAMY et al., 2011; PAN et al., 2017), kann auf Grundlage der Zeitverlaufsdaten auch ein geringerer Expressionsumfang festgestellt werden.

Als ein weiterer regulierender Parameter könnten auch Zielgen gesteuerte Mechanismen auf die miRNA-Expression einwirken. Es konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von Ziel-mRNAs zu einer verstärkten Prozessierung von bestimmten miRNAs führen kann (BOSE, BHATTACHARYYA, 2016). Zudem kann die miRNA-Stabilität über den Mechanismus der Zielgen-gesteuerten-miRNA-Degradierung (*target-directed miRNA degradation*) beeinflusst werden. Nach aktuellen Erkenntnissen führen dabei bestimmte Bindungskonstellationen im Rahmen der regulatorischen miRNA-Aktivität zu einer Entladung des miRISCs oder einer Offenlegung und Destabilisierung des miRNA-3'-Sequenzendes (PARK, SHIN, 2017; PARK et al., 2017; SHEU-GRUTTADURIA et al., 2019a). Auf Grundlage von Expressionsanalysen in verschiedenen humanen Zellmodellsystemen kann die Halbwertszeit der miR-223-3p in einem Zeitraum zwischen 15 h und 46 h liegen (BACCARINI et al., 2011). Dabei konnten Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen der miRNA-Abbaugeschwindigkeit und der regulatorischen miRNA-Funktion gefunden werden (BACCARINI et al., 2011). Anhand der vorliegenden Ergebnisse zeigt die miR-223-3p im Kontext der T-Zell-Aktivierung bereits innerhalb von 24 h eine Expressionsreduktion um mehr als die Hälfte der anfänglichen Expressionsmenge. Diese vergleichsweise kurze Dauer könnte somit in Verbindung mit einem Zielgen-gesteuerten-miRNA-Degradierungsmechanismus stehen.

Zudem könnte die miRNA-Expressionsdynamik im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses unter dem Einfluss von zellulären Exportmechanismen stehen. Im Rahmen der T-Zell-Aktivierung kommt es nachweislich zur Freisetzung von RNA-enthaltenden Vesikeln, die beispielsweise als inter-zelluläres Kommunikationssignal an die APC dienen können (CHIOU et al., 2018; MITTELBRUNN et al., 2011). Dabei konnte anhand von humanen CD4⁺ T-Zell-Untersuchungen gezeigt werden, dass bestimmte miRNAs Gegenstand des vesikulären Exports sein können. So konnte beispielsweise das Vorkommen der miR-19a-3p, miR-20a-5p, miR-21-5p und der miR-155-5p in extrazellulären Vesikeln nachgewiesen werden (TORRI et al., 2017). Auf Grundlage dessen wäre es denkbar, dass gezielte Exportprozesse die intrazelluläre Menge von miRNAs zu bestimmten Zeitpunkten der T-Zell-Aktivierung beeinflussen und somit modulierend auf die miRNA-Expressionsdynamik einwirken könnten.

Wie oben exemplarisch dargelegt können anhand der Ergebnisse dieser Arbeit zahlreiche Informationen zur möglichen Koordinierung der miRNA-Expression abgeleitet werden. Die vorliegenden Expressionsinformationen könnten somit die Datengrundlage für fortführende experimentelle Studien bilden und einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der T-Zell-Funktion leisten (MEHTA, BALTIMORE, 2016).

5.2.2. Spezifische Funktionen und funktionelle Interaktionen von miRNAs

Die Summe der unterschiedlichen Zielgen-Interaktionen scheint entscheidend für die biologische miRNA-Wirkung zu sein (CHRISTOPHER et al., 2016; GEBERT, MACRAE, 2019). MiRNA-induzierte Effekte auf einzelne Zielgene resultieren im Allgemeinen in einer eher moderaten Expressionsveränderung (SELBACH et al., 2008). Einige der hier identifizierten miRNA-Zielgene zeigen jedoch stark ausgeprägte mRNA-Expressionsveränderungen im Rahmen des T-Zell-Zeitverlaufs. Dies lässt vermuten, dass noch weitere Faktoren für die Expressionsregulation der entsprechenden mRNAs eine Rolle spielen könnten.

Die Verkürzung von mRNA-Halbwertszeiten im Zusammenhang mit der T-Zell-Aktivierung kann in Verbindung mit bestimmten regulatorischen Elementen gebracht werden (RAGHAVAN et al., 2002). Diese werden als Adenylat-Uridylat-reiche-Elemente (*AU-rich elements*, AREs) bezeichnet und sind in der Regel in den 3'UTR-Sequenzen von mRNAs lokalisiert (KHABAR, 2007; RAGHAVAN et al., 2002). Die Funktion dieser Elemente wird über RNA-bindende Proteine (RBPs) vermittelt, welche die Transkripte entweder stabilisieren oder für einen beschleunigten Abbau der mRNAs sorgen können (OTSUKA et al., 2019).

Neben den ARE bindenden Proteinen existieren eine Vielzahl weiterer RBP-Subtypen, welche durch die Bindung an bestimmte Sequenzmotive Einfluss auf die RNA-Stabilität nehmen können, aber auch auf die RNA-Prozessierung und -Lokalisierung einwirken (CORLEY et al., 2020; JIANG, COLLER, 2012). Die regulatorische Funktion von RBPs und miRNAs scheint in vielen Fällen eng miteinander verknüpft zu sein (JIANG, COLLER, 2012; KHABAR, 2007; RAGHAVAN et al., 2002). Bestimmte RBPs können durch Interaktion mit dem miRISC den miRNA-gekoppelten mRNA-Abbau fördern, während andere die Zielgen-Bindung und somit die miRNA-Funktionalität inhibieren (CONNERTY et al., 2015; KIM et al., 2009; KUNDU et al., 2012). Darüber hinaus können gegenseitige Einflüsse zwischen der miRNA- und der RBP-Expression bestehen (CIAFRE, GALARDI, 2013). Wechselwirkungen mit RBPs könnten somit auch zur post-transkriptionellen Regulation der hier beschriebenen miRNA-Zielgene beitragen (CIAFRE, GALARDI, 2013; JIANG, COLLER, 2012).

Ein Beispiel für ein RBP, welches über seine Interaktion mit ARE-Motiven den mRNA-Abbau reguliert (LYKKE-ANDERSEN, WAGNER, 2005) und das im Rahmen des T-Zell-Aktivierungsprozesses unter wechselseitigem Einfluss mit der miR-155-5p stehen könnte, ist das Ring-Finger-Protein ZFP36. Dieses scheint für die Koordinierung des frühen CD4+ T-Zell-Aktivierungsprozesses eine entscheidende Rolle zu spielen, indem es die Expressionsmenge von bestimmten Zytokinen, Komponenten des T-Zell-Rezeptor-Signalwegs und Transkriptionsfaktoren reguliert (MOORE et al., 2018). In den frühen Stunden des Aktivierungsprozesses wird dabei zunächst die ZFP36-Proteinherstellung induziert, während die Protein-Menge im späteren Verlauf wieder zurückgeht (MOORE et al., 2018). Anhand der vorliegenden Daten weist die ZFP36-mRNA während des 24-Stunden-Zeitverlaufs eine dazu passende Expressionsreduktion auf. Dabei konnte eine inverse Expressionskorrelation mit der miR-155-5p nachgewiesen werden. Die Daten einer vorangegangenen Studie enthielten erste Anhaltspunkte für eine miRNA-Zielgen-Beziehung zwischen der miR-155-5p und dem *ZFP36*-Gen (LIU et al., 2013a). Diese konnte im Rahmen dieser Arbeit auf Grundlage der dualen Luciferase-Assay-Testungen bestätigt werden. Untersuchungen an Lungen-Epithelzellen zeigen zudem, dass ZFP36 als negativer Regulator der miR-155-5p-Biogenese wirken kann (BHATTACHARYYA et al., 2013). ZFP36 könnte somit beispielhaft für eine regulatorische Verbindung zwischen der miRNA- und der RBP-Expression im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses stehen.

Eine weitere Verbindung zwischen der miRNA- und der RBP-Expression könnte auf Grundlage der Helicase DDX17 bestehen (CONNERTY et al., 2015; NGO et al., 2019). Diese ist in die miRNA-Biogenese involviert, indem sie an bestimmte pri-miRNAs bindet und damit die Prozessierungseffizienz des Drosha-DGCR8-Komplexes fördert (NGO et al., 2019). Im Rahmen der Luciferase-Assays konnte *DDX17* als ein Zielgen der miR-155-5p identifiziert werden.

Auf Grundlage dessen könnte die miR-155-5p-Expression über die Regulation von *DDX17* auf die Prozessierung weiterer miRNAs wirken.

Neben der Interaktion mit RNA-bindenden Proteinen, kann die regulatorische Wirkung von miRNAs auf einzelne ihrer Zielgene auch durch die Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen miRNAs potenziert werden (CIAFRE, GALARDI, 2013; DENZLER et al., 2016; GEBERT, MACRAE, 2019). Benachbarte miRNA-Bindestellen können dabei auf physikalischem Wege zu einer synergistischen Bindungskooperativität oder über eine Summierung des regulatorischen Effektes zu einer funktionellen Kooperativität führen (BRODERICK et al., 2011; GRIMSON et al., 2007; LAI et al., 2019). Durch die Analyse von miRNA-Zielgen-Netzwerken wurden im Rahmen dieser Arbeit gemeinsam exprimierte miRNA-Paare bestimmt, die kooperative Funktionen im Kontext des T-Zell-Aktivierungsprozesses erfüllen könnten. Als Auswahlparameter wurden dabei eine hohe molekulare miRNA-Expressionsmenge mit deutlicher Expressionsveränderung und einer deutlichen Schnittmenge von experimentell bestätigten Zielgenen gewählt. Kooperative miRNA-Wirkungen könnten allerdings auch der Kompensation von geringen miRNA-Expressionsmengen dienen (DENZLER et al., 2016; SHU et al., 2017). Darüber hinaus wurden für die Erstellung der Netzwerke auf Datenbank-Informationen zu experimentell bestätigten miRNA-Zielgen-Beziehungen zurückgegriffen, die jedoch auch unvollständige oder fehlerhafte Informationen enthalten können (HAMBERG et al., 2016; LEE et al., 2015b). Auf Grundlage dessen ist anzunehmen, dass noch weitere kooperative miRNA-Paarungen für die T-Zell-Funktion eine Rolle spielen, die im Rahmen des vorliegenden Analyse-Ansatzes nicht berücksichtigt wurden.

Als ein Paar mit abnehmender Expression und möglicher kooperativer Funktionalität wurden die miRNAs let-7b-5p und miR-26a-5p identifiziert. Gemeinsame Funktionen scheinen unter anderem in der Proliferationsinhibition und in der Regulierung von metabolischen Prozessen zu liegen (FU et al., 2014; WELLS et al., 2017; ZHAO et al., 2016). Dementsprechend konnte für beide miRNAs bereits gezeigt werden, dass eine Expressionsreduktion zur effektiven Steuerung der T-Zell-Aktivität beiträgt (WELLS et al., 2017; ZHAO et al., 2016). Als deutlicher Hinweis auf eine gekoppelte Funktionsweise konnte für verschiedene humane Zelllinien eine proportionale Beziehung zwischen der miR-26a-Expression und der Biogenese von verschiedenen miRNAs der let-7-Familie nachgewiesen werden, zu der auch die let-7b-5p zählt (FU et al., 2014). Als eine der potenziellen kooperativen miRNA-Paarungen mit steigendem Expressionsverlauf wurden die miR-17-5p und die miR-20a-5p des miR-17-92-*Clusters* identifiziert. Diese weisen eine hohe Ähnlichkeit zwischen den zugehörigen *seed*-Sequenzen auf (KHUU et al., 2016). Man geht davon aus, dass miRNAs mit ähnlicher *seed*-Sequenz häufig

auch gemeinsame Zielgene regulieren (CHIPMAN, PASQUINELLI, 2019; CONCEPCION et al., 2012; OLIVE et al., 2010). In Übereinstimmung mit dieser Vermutung gibt es Hinweise, dass die miR-17-5p und miR-20a-5p in bestimmten Zelltypen synergistische Funktionen erfüllen und dadurch beispielsweise die Zellproliferation fördern (CONCEPCION et al., 2012; O'DONNELL et al., 2005; TROMPETER et al., 2011). Spezifische Basenpaarbindungen außerhalb der *seed*-Region könnten bei bestimmten Zielgenen allerdings auch zu einer unterschiedlichen regulatorischen Aktivität führen (BROUGHTON et al., 2016). Somit ist trotz vergleichbarer *seed*-Sequenzen nicht grundsätzlich von einer funktionellen Redundanz der miR-17-5p und der miR-20a-5p auszugehen (GREENBERG et al., 2014). Als ein weiteres miRNA-Paar mit steigender Expression und möglicher kooperativer Funktion wurden auf Grundlage der miRNA-Zielgen-Netzwerks-Analysen die miR-21-5p und die miR-155-5p vorhergesagt. Anhand zahlreicher experimenteller Studien und in Übereinstimmung mit der vorliegenden miR-155-5p-Zielgen-Identifizierung scheinen die betreffenden miRNAs in Immunzellen ein großes Zielgen-Spektrum zu regulieren und dabei auf eine Vielzahl zellulärer Signalprozesse einzuwirken (KROESEN et al., 2015; RODRIGUEZ et al., 2007; SHEEDY, 2015). Beide miRNAs gelten als zentrale Modulatoren der T-Zell-Aktivität (CARISSIMI et al., 2014; LIND, OHASHI, 2014; SHEEDY, 2015).

Um näheren Aufschluss über die postulierte miRNA-Interaktion zu erhalten, wurden in dieser Arbeit potenzielle gemeinsame Zielgene der miR-21-5p und der miR-155-5p mittels dualen Luciferase-Assays getestet. Anhand der Testung der *LEMD3*-3'UTR konnte eine synergistische Zielgen-Regulation durch gemeinsame miRNA-Expression bestätigt werden. Dabei war durch die Co-Expression eine Verstärkung des regulatorischen Effektes der miR-21-5p zu beobachten, während für die alleinige Überexpression der miR-155-5p keine regulatorische Wirkung nachweisbar war. Dementsprechend könnte es sich im spezifischen Falle um eine Form der Bindungskoopertivität handeln (BRODERICK et al., 2011). Es ist anzunehmen, dass funktionelle Interaktionen zwischen der miR-21-5p und der miR-155-5p zur effektiven Regulation des T-Zell-Aktivierungsprozesses beitragen könnten. Anhand von Untersuchungen an T-Zellen von Mäusen wurde zudem gezeigt, dass die Expression des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2K durch die gemeinsame Aktivität des miR-21-5p-miR-155-5p-Paares reguliert wird (JEKER, BLUESTONE, 2013; SANDBERG et al., 2008). Im Zusammenhang mit der evolutionären Stabilität der spezifischen miRNA-Sequenzen (KRICHEVSKY, GABRIELY, 2009; MASHIMA, 2015) könnte dies auf eine Konservierung der kooperativen miRNA-Funktionsweise hindeuten (FLAMAND et al., 2017; FRIEDMAN et al., 2009).

5.3. Potenzial zur anwendungsbasierten Nutzung der miRNA-Expressionsinformationen

5.3.1. Mögliche Nutzung im Rahmen der Biomarker-Forschung

Biomarker dienen im Rahmen der klinischen Diagnostik und Prognostik als messbarer Parameter zur objektiven Bewertung des Gesundheitszustandes (DIENER et al., 2019; SHIGEYASU et al., 2017; STRIMBU, TAVEL, 2010). Wegen ihres Bezugs zu verschiedenen Krankheitsmechanismen und der Detektionsmöglichkeiten durch etablierte molekularbiologische Techniken gelten miRNAs als besonders aussichtsreiche Kandidaten in der Biomarker-Forschung (HUANG, 2017; ROBINSON et al., 2013; WANG et al., 2016a).

T-Lymphozyten spielen in einer Vielzahl unterschiedlicher Pathomechanismen eine zentrale Rolle. Dazu zählen Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen (CHEN, JOHN WHERRY, 2020; DORNMAIR et al., 2003), aber auch neurodegenerative Erkrankungen oder Krebs (MOLON et al., 2016; TAN et al., 2020). Die Evaluierung von T-Zell gekoppelten miRNA-Expressionsveränderungen stellt somit einen vielversprechenden Ansatzpunkt im Bereich der Biomarker-Forschung dar (INCORVAIA et al., 2020; SAKI et al., 2015; SCHERM, DANIEL, 2020).

Für die Auswahl von möglichen Biomarkern ist eine hohe Reproduzierbarkeit essenziell (STRIMBU, TAVEL, 2010). Immun-gekoppelte Signalwege weisen jedoch häufig eine hohe interindividuelle Variabilität auf (BRODIN, DAVIS, 2017). Im Rahmen dieser Arbeit konnten spezifische miRNA-Expressionsprofile mit sowohl biologisch als auch technisch reproduzierbaren Zeitverlaufsmustern nachgewiesen werden. Dies könnte auf generalisierbare Abläufe im Rahmen der miRNA-Expressionsregulation schließen lassen. Durch alters- oder geschlechtsbedingte Unterschiede in der Immunfunktionalität können sich Änderungen der miRNA-Expressionsprofile ergeben (DAI, AHMED, 2014; KVERNELAND et al., 2016; YE et al., 2018). Veränderte miRNA-Zeitverläufe könnten allerdings auch auf eine veränderte T-Zell-Aktivität im Zusammenhang mit Erkrankungen hindeuten. Auf Grundlage dessen wäre eine anwendungsbasierte Weiterentwicklung der zeitaufgelösten Expressionsanalysen im Rahmen der Biomarker-Identifizierung denkbar. In Verbindung mit mRNA- und Protein-Untersuchungen (DIENG et al., 2020; WILK, BRAUN, 2018; ZHOU et al., 2014) könnten entsprechende Zeitverlaufsstudien zudem dabei helfen die mechanistischen Grundlagen von T-Zell gekoppelten Erkrankungen aufzuklären.

5.3.2. Möglicher Nutzen für die Entwicklung von miRNA-basierten Therapien

Im Zusammenhang mit der Entwicklung von innovativen Therapieansätzen könnten synthetische miRNAs und miRNA-Inhibitoren für die gezielte Manipulation der Zell-Funktion genutzt werden (GIRI et al., 2019; JI et al., 2016; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017). T-Zellen sind in diesem Zusammenhang besonders prädestiniert, da sie entscheidend an der Immunabwehr beteiligt sind (JANEWAY et al., 1975; MATTER, 1974; ZHU, 2018). Des Weiteren können sie mit geringer Invasivität aus Patientenblut isoliert, außerhalb des Körpers manipuliert und im Rahmen eines adoptiven Zelltransfers über die Blutbahn wieder in den Körper zurückgeführt werden (MAROFI et al., 2021; MAUS et al., 2014). Zur Behandlung von bestimmten Tumoren wurde beispielweise die sogenannte CAR (*chimeric antigen receptor*)-T-Zell-Therapie entwickelt. Dabei werden die adoptiven T-Zellen außerhalb des Körpers gentechnisch manipuliert, so dass sie Oberflächenrezeptoren exprimieren, die gegen Tumor-spezifische Antigene gerichtet sind (MAROFI et al., 2021; MAUS et al., 2014; SOMMERMEYER et al., 2016). Die gentechnisch-veränderten T-Zellen können somit eine gezielte Immunantwort gegen den Tumor auslösen (MAUS et al., 2014). Bei manchen Krebserkrankungen mindern immuninhibierende Signale in der Tumorumgebung jedoch die Effizienz von adoptiven Immuntherapien (TAHMASEBI et al., 2019; ZOU, 2005). Durch den gezielten Einsatz von miRNAs könnte im Rahmen von CAR-T-Zell-Therapien beispielsweise eine Verbesserung der Anti-Tumor-Reaktivität erreicht werden (JI et al., 2016). Ziele einer miRNA-basierten Manipulation könnte dabei eine Förderung der T-Zell-Fitness, der Überlebensfähigkeit oder der Effektor-Zell-Funktionalität sein (CORTEZ et al., 2019; JI et al., 2016; LIN et al., 2014; OHNO et al., 2013). Darüber hinaus könnten miRNA-basierte Therapeutika durch eine zielgerichtete Applikation innerhalb des Körpers zur Behandlung bestimmter T-Zell gekoppelter Erkrankungen und Infektionen eingesetzt werden (GIRI et al., 2019; LUCK et al., 2015). Detaillierte Kenntnisse zur miRNA-Funktion sind somit essenziell, um die Effekte von miRNA-basierten Medikamenten abschätzen und potente miRNA-Kandidaten für die therapeutische T-Zell-Manipulation auswählen zu können (GIRI et al., 2019; JI et al., 2016).

Auf Grundlage der vorliegenden zeitaufgelösten Expressionsdaten können anhand von deutlichen und reproduzierbaren Veränderungen zahlreiche miRNAs bestimmt werden, die wichtige Schnittstellen in der T-Zell-Aktivitätsregulation darstellen könnten. Dabei können mithilfe der Zeitverlaufsinformationen, wie oben in der Diskussion dargelegt, zudem funktionelle Zusammenhänge identifiziert werden, die neue Möglichkeiten für eine miRNA-basierte T-Zell-Manipulation eröffnen könnten (EKIZ et al., 2019; GIRI et al., 2019).

Die funktionelle Wirkung von miRNAs scheint eng mit der Expressionsmenge verknüpft zu sein (NARAYAN et al., 2017; SHU et al., 2012). Eine Überdosierung könnte im Rahmen einer therapeutischen Nutzung dementsprechend zu toxischen Nebeneffekten führen (LAI et al., 2019; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017). Um im Hinblick auf die Therapie-Entwicklung Informationen zur physiologischen miRNA-Expression zu erlangen, wurde in dieser Arbeit eine quantitative Auswertung der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten vorgenommen. Darüber hinaus ergeben sich durch die quantitativen miRNA-Expressionsdaten Möglichkeiten, um T-zelluläre miRNA-Funktionen mit spezifischem Bezug zur Expressionsmenge zu untersuchen (KHAN et al., 2009; NARAYAN et al., 2017; SHU et al., 2012). Wegen ihrer zentralen Rolle im Rahmen der Immunantwort (RODRIGUEZ et al., 2007), könnte insbesondere die miR-155-5p das Ziel zukunftsweisender Therapie-Strategien sein (EKIZ et al., 2019; JI et al., 2019). Daher wurde im Rahmen der quantitativen Expressionsanalysen ein besonderer Schwerpunkt auf die miR-155-5p gelegt, um Möglichkeiten für eine physiologisch-angepasste miRNA-Manipulation aufzuzeigen.

Wie oben bereits dargelegt konnte durch die Zielgen-Identifizierung in dieser Arbeit außerdem ein Beitrag zur funktionellen Charakterisierung der miR-155-5p geleistet und eine kooperative Interaktion mit der miR-21-5p belegt werden. Entsprechende Informationen zu synergistischen miRNA-Funktionen könnten Möglichkeiten aufzeigen, um durch die kombinierte Nutzung unterschiedlicher miRNAs mit einer jeweils geringen Einzel-Dosierung dennoch eine wirksame Manipulation von zellulären Signalprozessen zu erzielen (LAI et al., 2019).

Da die deregulierte Expression von miRNAs auch zur Entstehung von Tumoren oder zu neurodegenerativen Erkrankungen beitragen kann (PAUL et al., 2020; SHAH et al., 2016), wäre eine erweiterte Nutzung der T-Zell basierten Daten im Hinblick auf die Therapie-Entwicklung denkbar. So gelten viele der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten miRNAs, wie zum Beispiel die miR-223-3p, das miR-17-92-*Cluster* oder die miR-155-5p als onkogene miRNAs (SAKI et al., 2015). Im Gegensatz dazu scheint es sich beispielsweise bei der miR-26a-5p oder der let-7-Familie in vielen Gewebetypen um miRNAs mit Tumor-suppressiver Funktion zu handeln (GILLES, SLACK, 2018; KOTA et al., 2009). Somit könnten diese miRNAs auch in anderen Zellsystemen das Ziel einer therapeutischen Expressionsmanipulation sein (SHAH et al., 2016). Da sich die Gesamt-RNA-Menge in der Regel zwischen unterschiedlichen Zelltypen unterscheidet (ISLAM et al., 2011; SASAGAWA et al., 2013) und darüber hinaus die miRNA-Expression sowie -Funktion in Abhängigkeit des zellulären Kontextes stehen (GULYAEVA, KUSHLINSKIY, 2016; HSIN et al., 2018; NAM et al., 2014), wäre die Übertragbarkeit der quantitativen Expressionsdaten sowie der funktionellen und expressionellen Verkettungen jeweils spezifisch zu prüfen.

Die intravenöse Verabreichung von synthetischen miRNAs zur klinischen Behandlung von Krebs-Erkrankungen hat in der Vergangenheit zu starken immunologischen Nebenwirkungen geführt (BEG et al., 2017; CORTEZ et al., 2019; HONG et al., 2020). Die T-Zell basierten Untersuchungen dieser Arbeit weisen in Übereinstimmung mit zahlreichen weiteren immunologischen Studien auf die komplexe Verbindung zwischen der miRNA-Expression und der Immunzell-Funktion hin (CHEN et al., 2013; JIA, WEI, 2020; WINKLE et al., 2021). Auf Grundlage dessen ist es für die künftige Entwicklung von miRNA-basierten Krebs-Therapiestudien entscheidend die möglichen Risiken in Bezug auf das Immunsystem gezielt zu evaluieren (ABD-AZIZ et al., 2020; CORTEZ et al., 2019; HART et al., 2020; WINKLE et al., 2021). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zur Expression und Wirkung von miRNAs bilden die Grundlage für ein besseres Verständnis von miRNA-regulierten Netzwerken im Kontext des frühen T-Zell-Aktivierungsprozesses. Im Hinblick auf mögliche immunologische Nebenwirkungen könnten sie daher künftig dazu beitragen eine erste Risikoeinschätzung für miRNA-basierte Therapien vornehmen zu können.

5.4. Fazit und Ausblick

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Erfassung, der funktionellen Charakterisierung und Quantifizierung von miRNA-Expressionsveränderungen im Zusammenhang mit der frühen 24 h-Phase der humanen CD4+ T-Zell-Aktivierung. Es wurden detaillierte, zeitaufgelöste Datensätze zur miRNA- und mRNA-Expression für die ersten 24 h der T-Zell-Aktivierung erstellt. Mithilfe der Zeitverlaufsdaten können Rückschlüsse zur Koordinierung und zur spezifischen Funktion von miRNAs gezogen und somit aktuelle Themengebiete der immunbiologischen Forschung adressiert werden (GIRI et al., 2019; JIA, WEI, 2020; MEHTA, BALTIMORE, 2016). Als Schnittstelle zum biomedizinischen Anwendungsbereich können im Kontext des Aktivierungsprozesses zentral veränderte miRNAs identifiziert werden, die im Rahmen von zukunftsweisenden Therapien für die gezielte Manipulation von spezifischen T-Zell-Funktionen genutzt werden könnten (GIRI et al., 2019; JI et al., 2016; LUCK et al., 2015). Darüber hinaus liefern quantitative Auswertungen der miRNA-Zeitverlaufsdaten umfangreiche Informationen zur molekularen miRNA-Expression vor dem Hintergrund des T-Zell-Aktivierungsprozesses, welche im Hinblick auf miRNA-basierten Therapie-Einsatz für die Bestimmung einer physiologisch-angepassten Dosierung herangezogen werden können (LAI et al., 2019; RUPAIMOOLE, SLACK, 2017).

Insgesamt leisten die vorliegenden Untersuchungen somit einen wichtigen Beitrag zur Entschlüsselung der koordinierten miRNA-Expression im Rahmen der T-Zell-Aktivierung und liefern eine umfassende Datengrundlage zur Aufklärung von miRNA-regulierten Signalnetzwerken sowie für die Entwicklung von miRNA-basierten Therapien.

6. Literaturverzeichnis

1. Abd-Aziz N, Kamaruzman NI, Poh CL (2020) Development of MicroRNAs as Potential Therapeutics against Cancer. *J Oncol* 2020:8029721
2. Adighibe O, Pezzella F (2018) The Role of JMY in p53 Regulation. *Cancers (Basel)* 10
3. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4
4. Agilent Technologies Inc. H. Human microRNA Microarrays - Details & Specifications (<https://www.agilent.com/en/human-microRNA-microarrays-details-specifications> (Abgerufen am 29.04.2021), Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten)
5. Akhtar S, Al-Zaid B, El-Hashim AZ, Chandrasekhar B, Attur S, Yousif MH, Benter IF (2015) Cationic Polyamidoamine Dendrimers as Modulators of EGFR Signaling In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 10:e0132215
6. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801
7. Akoglu H (2018) User's guide to correlation coefficients. *Turk J Emerg Med* 18:91-93
8. Ali S, Huber M, Kollewe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU (2007) IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18660-18665
9. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, Hart M, Abu-Halima M, Grasser FA, Lenhof HP, Keller A, Meese E (2019) An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res* 47:3353-3364
10. Androvic P, Valihrach L, Elling J, Sjoback R, Kubista M (2017) Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res* 45:e144
11. Arvey A, Larsson E, Sander C, Leslie CS, Marks DS (2010) Target mRNA abundance dilutes microRNA and siRNA activity. *Mol Syst Biol* 6:363
12. Austyn JM, Steinman RM, Weinstein DE, Granelli-Piperno A, Palladino MA (1983) Dendritic cells initiate a two-stage mechanism for T lymphocyte proliferation. *J Exp Med* 157:1101-1115
13. Avraham R, Yarden Y (2012) Regulation of signalling by microRNAs. *Biochem Soc Trans* 40:26-30
14. Baccarini A, Chauhan H, Gardner TJ, Jayaprakash AD, Sachidanandam R, Brown BD (2011) Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells. *Curr Biol* 21:369-376
15. Backes C, Keller A, Kuentzer J, Kneissl B, Comtesse N, Elnakady YA, Muller R, Meese E, Lenhof HP (2007) GeneTrail--advanced gene set enrichment analysis. *Nucleic Acids Res* 35:W186-192
16. Bar-Joseph Z, Gitter A, Simon I (2012) Studying and modelling dynamic biological processes using time-series gene expression data. *Nat Rev Genet* 13:552-564
17. Barlev NA, Emelyanov AV, Castagnino P, Zegerman P, Bannister AJ, Sepulveda MA, Robert F, Tora L, Kouzarides T, Birshstein BK, Berger SL (2003) A novel human Ada2 homologue functions with Gcn5 or Brg1 to coactivate transcription. *Mol Cell Biol* 23:6944-6957

6. Literaturverzeichnis

18. Barrett JC, Kawasaki ES (2003) Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. *Drug Discov Today* 8:134-141
19. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297
20. Baumjohann D, Ansel KM (2013) MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nat Rev Immunol* 13:666-678
21. Beales PL, Bland E, Tobin JL, Bacchelli C, Tuysuz B, Hill J, Rix S, Pearson CG, Kai M, Hartley J, Johnson C, Irving M, Elcioglu N, Winey M, Tada M, Scambler PJ (2007) IFT80, which encodes a conserved intraflagellar transport protein, is mutated in Jeune asphyxiating thoracic dystrophy. *Nat Genet* 39:727-729
22. Beg MS, Brenner AJ, Sachdev J, Borad M, Kang YK, Stoudemire J, Smith S, Bader AG, Kim S, Hong DS (2017) Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 35:180-188
23. Beitzinger M, Peters L, Zhu JY, Kremmer E, Meister G (2007) Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol* 4:76-84
24. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 57:289-300
25. Benjamini Y, Yekutieli D (2001) The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann Statist* 29:1165-1188
26. Bergmans HE, van Die IM, Hoekstra WP (1981) Transformation in *Escherichia coli*: stages in the process. *J Bacteriol* 146:564-570
27. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C (2008) The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 36:D149-153
28. Bevan MJ (2004) Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* 4:595-602
29. Bhattacharyya S, Kumar P, Tsuchiya M, Bhattacharyya A, Biswas R (2013) Regulation of miR-155 biogenesis in cystic fibrosis lung epithelial cells: antagonistic role of two mRNA-destabilizing proteins, KSRP and TTP. *Biochem Biophys Res Commun* 433:484-488
30. Bierer BE, Greenstein JL, Sleckman B, Ratnofsky S, Peterson A, Seed B, Burakoff SJ (1988) Functional analysis of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Ann N Y Acad Sci* 532:199-206
31. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
32. Bissels U, Wild S, Tomiuk S, Holste A, Hafner M, Tuschl T, Bosio A (2009) Absolute quantification of microRNAs by using a universal reference. *RNA* 15:2375-2384
33. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10:185-191
34. Bonilla FA, Oettgen HC (2010) Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125:S33-40
35. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495-503
36. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13:1097-1101

6. Literaturverzeichnis

37. Bose M, Bhattacharyya SN (2016) Target-dependent biogenesis of cognate microRNAs in human cells. *Nat Commun* 7:12200
38. Bosson AD, Zamudio JR, Sharp PA (2014) Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition. *Mol Cell* 56:347-359
39. Brandstadter JD, Maillard I (2019) Notch signalling in T cell homeostasis and differentiation. *Open Biol* 9:190187
40. Braun AC, Olayioye MA (2015) Rho regulation: DLC proteins in space and time. *Cell Signal* 27:1643-1651
41. Broderick JA, Salomon WE, Ryder SP, Aronin N, Zamore PD (2011) Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *RNA* 17:1858-1869
42. Brodin P, Davis MM (2017) Human immune system variation. *Nat Rev Immunol* 17:21-29
43. Bronevetsky Y, Villarino AV, Eislely CJ, Barbeau R, Barczak AJ, Heinz GA, Kremmer E, Heissmeyer V, McManus MT, Erle DJ, Rao A, Ansel KM (2013) T cell activation induces proteasomal degradation of Argonaute and rapid remodeling of the microRNA repertoire. *J Exp Med* 210:417-432
44. Brosseron F, May C, Schoenebeck B, Tippler B, Woitalla D, Kauth M, Brockmann K, Meyer HE, Berg D, Bufe A, Marcus K (2012) Stepwise isolation of human peripheral erythrocytes, T lymphocytes, and monocytes for blood cell proteomics. *Proteomics Clin Appl* 6:497-501
45. Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE (2016) Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell* 64:320-333
46. Brown BD, Gentner B, Cantore A, Colleoni S, Amendola M, Zingale A, Baccarini A, Lazzari G, Galli C, Naldini L (2007) Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat Biotechnol* 25:1457-1467
47. Brown M, Suryawanshi H, Hafner M, Farazi TA, Tuschl T (2013) Mammalian miRNA curation through next-generation sequencing. *Front Genet* 4:145
48. Bumgarner R (2013) Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 22:Unit 22 21
49. Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169-193
50. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10:1957-1966
51. Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austerhammer B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY, Ma Y, Maqsoodi B, Papallo A, Peters EH, Poulter K, Ruppel PL, Samaha RR, Shi L, Yang W, Zhang L, Goodsaid FM (2006) Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol* 24:1115-1122
52. Carissimi C, Carucci N, Colombo T, Piconese S, Azzalin G, Cipolletta E, Citarella F, Barnaba V, Macino G, Fulci V (2014) miR-21 is a negative modulator of T-cell activation. *Biochimie* 107 Pt B:319-326
53. Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA (2007) IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol* 179:2551-2555

6. Literaturverzeichnis

54. Chakraborty S, Mehtab S, Patwardhan A, Krishnan Y (2012) Pri-miR-17-92a transcript folds into a tertiary structure and autoregulates its processing. *RNA* 18:1014-1028
55. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT (2008) Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 40:43-50
56. Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125:S3-23
57. Chapman EJ, Carrington JC (2007) Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet* 8:884-896
58. Chaulk SG, Thede GL, Kent OA, Xu Z, Gesner EM, Veldhoen RA, Khanna SK, Goping IS, MacMillan AM, Mendell JT, Young HS, Fahlman RP, Glover JN (2011) Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis. *RNA Biol* 8:1105-1114
59. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33:e179
60. Chen CZ, Schaffert S, Fragoso R, Loh C (2013) Regulation of immune responses and tolerance: the microRNA perspective. *Immunol Rev* 253:112-128
61. Chen Z, John Wherry E (2020) T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol* 20:529-536
62. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436:740-744
63. Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, Johnston WK, Russ C, Luo S, Babiarz JE, Blalock R, Schroth GP, Nusbaum C, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev* 24:992-1009
64. Chiou NT, Kageyama R, Ansel KM (2018) Selective Export into Extracellular Vesicles and Function of tRNA Fragments during T Cell Activation. *Cell Rep* 25:3356-3370 e3354
65. Chipman LB, Pasquinelli AE (2019) miRNA Targeting: Growing beyond the Seed. *Trends Genet* 35:215-222
66. Cho S, Wu CJ, Yasuda T, Cruz LO, Khan AA, Lin LL, Nguyen DT, Miller M, Lee HM, Kuo ML, Broide DH, Rajewsky K, Rudensky AY, Lu LF (2016) miR-23 approximately 27 approximately 24 clusters control effector T cell differentiation and function. *J Exp Med* 213:235-249
67. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
68. Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1:581-585
69. Chong MM, Rasmussen JP, Rudensky AY, Littman DR (2008) The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *J Exp Med* 205:2005-2017
70. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, Huang WC, Sun TH, Tu SJ, Lee WH, Chiew MY, Tai CS, Wei TY, Tsai TR, Huang HT, Wang CY, Wu HY, Ho SY, Chen PR, Chuang CH, Hsieh PJ, Wu YS, Chen WL, Li MJ, Wu YC, Huang XY, Ng FL, Buddhakosai W,

- Huang PC, Lan KC, Huang CY, Weng SL, Cheng YN, Liang C, Hsu WL, Huang HD (2018) miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 46:D296-D302
71. Choudhuri S (2010) Small noncoding RNAs: biogenesis, function, and emerging significance in toxicology. *J Biochem Mol Toxicol* 24:195-216
 72. Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, Kaur A, Gupta V, Bansal P (2016) MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res* 7:68-74
 73. Chuang SS, Helvig C, Taimi M, Ramshaw HA, Collop AH, Amad M, White JA, Petkovich M, Jones G, Korczak B (2004) CYP2U1, a novel human thymus- and brain-specific cytochrome P450, catalyzes omega- and (omega-1)-hydroxylation of fatty acids. *J Biol Chem* 279:6305-6314
 74. Chugh P, Dittmer DP (2012) Potential pitfalls in microRNA profiling. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3:601-616
 75. Ciafre SA, Galardi S (2013) microRNAs and RNA-binding proteins: a complex network of interactions and reciprocal regulations in cancer. *RNA Biol* 10:935-942
 76. Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:2110-2114
 77. Colamatteo A, Micillo T, Bruzzaniti S, Fusco C, Garavelli S, De Rosa V, Galgani M, Spagnuolo MI, Di Rella F, Puca AA, de Candia P, Matarese G (2019) Metabolism and Autoimmune Responses: The microRNA Connection. *Front Immunol* 10:1969
 78. Concepcion CP, Bonetti C, Ventura A (2012) The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer J* 18:262-267
 79. Connerty P, Ahadi A, Hutvagner G (2015) RNA Binding Proteins in the miRNA Pathway. *Int J Mol Sci* 17
 80. Consortium EP (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489:57-74
 81. Consortium M, Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, Collins PJ, de Longueville F, Kawasaki ES, Lee KY, Luo Y, Sun YA, Willey JC, Setterquist RA, Fischer GM, Tong W, Dragan YP, Dix DJ, Frueh FW, Goodsaid FM, Herman D, Jensen RV, Johnson CD, Lobenhofer EK, Puri RK, Schrf U, Thierry-Mieg J, Wang C, Wilson M, Wolber PK, Zhang L, Amur S, Bao W, Barbacioru CC, Lucas AB, Bertholet V, Boysen C, Bromley B, Brown D, Brunner A, Canales R, Cao XM, Cebula TA, Chen JJ, Cheng J, Chu TM, Chudin E, Corson J, Corton JC, Croner LJ, Davies C, Davison TS, Delenstarr G, Deng X, Dorris D, Eklund AC, Fan XH, Fang H, Fulmer-Smentek S, Fuscoe JC, Gallagher K, Ge W, Guo L, Guo X, Hager J, Haje PK, Han J, Han T, Harbottle HC, Harris SC, Hatchwell E, Hauser CA, Hester S, Hong H, Hurban P, Jackson SA, Ji H, Knight CR, Kuo WP, LeClerc JE, Levy S, Li QZ, Liu C, Liu Y, Lombardi MJ, Ma Y, Magnuson SR, Maqsodi B, McDaniel T, Mei N, Myklebost O, Ning B, Novoradovskaya N, Orr MS, Osborn TW, Papallo A, Patterson TA, Perkins RG, Peters EH, Peterson R, Philips KL, Pine PS, Pusztai L, Qian F, Ren H, Rosen M, Rosenzweig BA, Samaha RR, Schena M, Schroth GP, Shchegrova S, Smith DD, Staedtler F, Su Z, Sun H, Szallasi Z, Tezak Z, Thierry-Mieg D, Thompson KL, Tikhonova I, Turpaz Y, Vallanat B, Van C, Walker SJ, Wang SJ, Wang Y, Wolfinger R, Wong A, Wu J, Xiao C, Xie Q, Xu J, Yang W, Zhang L, Zhong S, Zong Y, Slikker W,

- Jr. (2006) The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 24:1151-1161
82. Cooper MD, Alder MN (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 124:815-822
83. Corley M, Burns MC, Yeo GW (2020) How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms. *Mol Cell* 78:9-29
84. Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M (2019) Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci* 20
85. Cortez MA, Anfossi S, Ramapriyan R, Menon H, Atalar SC, Aliru M, Welsh J, Calin GA (2019) Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 58:244-253
86. Costa MC, Leitao AL, Enguita FJ (2012) Biogenesis and mechanism of action of small non-coding RNAs: insights from the point of view of structural biology. *Int J Mol Sci* 13:10268-10295
87. Coutinho LL, Matukumalli LK, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Gasbarre LC, Capuco AV, Smith TP (2007) Discovery and profiling of bovine microRNAs from immune-related and embryonic tissues. *Physiol Genomics* 29:35-43
88. Czech B, Munafo M, Ciabrelli F, Eastwood EL, Fabry MH, Kneuss E, Hannon GJ (2018) piRNA-Guided Genome Defense: From Biogenesis to Silencing. *Annu Rev Genet* 52:131-157
89. D'Andrade PN, Fulmer-Smentek S (2012) Agilent microRNA microarray profiling system. *Methods Mol Biol* 822:85-102
90. Dai R, Ahmed SA (2014) Sexual dimorphism of miRNA expression: a new perspective in understanding the sex bias of autoimmune diseases. *Ther Clin Risk Manag* 10:151-163
91. Dainiak MB, Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B (2007) Methods in cell separations. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 106:1-18
92. Daniels SI, Sille FC, Goldbaum A, Yee B, Key EF, Zhang L, Smith MT, Thomas R (2014) Improving power to detect changes in blood miRNA expression by accounting for sources of variability in experimental designs. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23:2658-2666
93. Darzynkiewicz Z, Evenson D, Staiano-Coico L, Sharpless T, Melamed MR (1979) Relationship between RNA content and progression of lymphocytes through S phase of cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:358-362
94. Davies J, Denyer T, Hadfield J (2016) Bioanalyzer chips can be used interchangeably for many analyses of DNA or RNA. *Biotechniques* 60:197-199
95. de Hoon MJ, Taft RJ, Hashimoto T, Kanamori-Katayama M, Kawaji H, Kawano M, Kishima M, Lassmann T, Faulkner GJ, Mattick JS, Daub CO, Carninci P, Kawai J, Suzuki H, Hayashizaki Y (2010) Cross-mapping and the identification of editing sites in mature microRNAs in high-throughput sequencing libraries. *Genome Res* 20:257-264
96. de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, Ashoor H, Astrom G, Babina M, Bertin N, Burroughs AM, Carlisle AJ, Daub CO, Detmar M, Deviatiiarov R, Fort A, Gebhard C, Goldowitz D, Guhl S, Ha TJ, Harshbarger J, Hasegawa A, Hashimoto K, Herlyn M, Heutink P, Hitchens KJ, Hon CC, Huang E, Ishizu Y, Kai C, Kasukawa T, Klinken P, Lassmann T, Lecellier CH, Lee W, Lizio M, Makeev V, Mathelier A, Medvedeva YA, Mejhert N, Mungall CJ, Noma S, Ohshima M, Okada-Hatakeyama M, Persson H, Rizzu P, Roudnický F, Saetrom P, Sato H, Severin J, Shin

- JW, Swoboda RK, Tarui H, Toyoda H, Vitting-Seerup K, Winteringham L, Yamaguchi Y, Yasuzawa K, Yoneda M, Yumoto N, Zabierowski S, Zhang PG, Wells CA, Summers KM, Kawaji H, Sandelin A, Rehli M, Consortium F, Hayashizaki Y, Carninci P, Forrest ARR, de Hoon MJL (2017) An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat Biotechnol* 35:872-878
97. de Wet JR, Wood KV, Helinski DR, DeLuca M (1985) Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7870-7873
98. Delidow BC (1997) Molecular cloning of PCR fragments with cohesive ends. *Mol Biotechnol* 8:53-60
99. Delves PJ, Roitt IM (2000) The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:37-49
100. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432:231-235
101. Denzler R, McGeary SE, Title AC, Agarwal V, Bartel DP, Stoffel M (2016) Impact of MicroRNA Levels, Target-Site Complementarity, and Cooperativity on Competing Endogenous RNA-Regulated Gene Expression. *Mol Cell* 64:565-579
102. Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, Singer A, Postlethwait JH (2015) miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends Genet* 31:613-626
103. Dhers L, Ducassou L, Boucher JL, Mansuy D (2017) Cytochrome P450 2U1, a very peculiar member of the human P450s family. *Cell Mol Life Sci* 74:1859-1869
104. Diamantopoulos MA, Tsiakanikas P, Scorilas A (2018) Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in cancer. *Ann Transl Med* 6:241
105. Diener C, Hart M, Alansary D, Poth V, Walch-Ruckheim B, Menegatti J, Grasser F, Fehlmann T, Rheinheimer S, Niemeyer BA, Lenhof HP, Keller A, Meese E (2018) Modulation of intracellular calcium signaling by microRNA-34a-5p. *Cell Death Dis* 9:1008
106. Diener C, Galata V, Keller A, Meese E (2019) MicroRNA profiling from dried blood samples. *Crit Rev Clin Lab Sci* 56:111-117
107. Diener C, Hart M, Kehl T, Rheinheimer S, Ludwig N, Krammes L, Pawusch S, Lenhof K, Tanzer T, Schub D, Sester M, Walch-Ruckheim B, Keller A, Lenhof HP, Meese E (2020) Quantitative and time-resolved miRNA pattern of early human T cell activation. *Nucleic Acids Res* 48:10164-10183
108. Dieng MM, Diawara A, Manikandan V, Tamim El Jarkass H, Serme SS, Sombie S, Barry A, Coulibaly SA, Diarra A, Drou N, Arnoux M, Yousif A, Tiono AB, Sirima SB, Soulama I, Idaghdour Y (2020) Integrative genomic analysis reveals mechanisms of immune evasion in *P. falciparum* malaria. *Nat Commun* 11:5093
109. Diogo MM, Queiroz JA, Prazeres DM (2005) Chromatography of plasmid DNA. *J Chromatogr A* 1069:3-22
110. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 1793:1008-1022

111. Dong C (2006) Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol* 6:329-333
112. Dornmair K, Goebels N, Weltzien HU, Wekerle H, Hohlfeld R (2003) T-cell-mediated autoimmunity: novel techniques to characterize autoreactive T-cell receptors. *Am J Pathol* 163:1215-1226
113. Draghici S, Khatri P, Eklund AC, Szallasi Z (2006) Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet* 22:101-109
114. Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:11-22
115. Dunand-Sauthier I, Santiago-Raber ML, Capponi L, Vejnar CE, Schaad O, Irla M, Seguin-Estevez Q, Descombes P, Zdobnov EM, Acha-Orbea H, Reith W (2011) Silencing of c-Fos expression by microRNA-155 is critical for dendritic cell maturation and function. *Blood* 117:4490-4500
116. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N (2011) miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform* 44:839-847
117. Dweep H, Gretz N (2015) miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods* 12:697
118. Dyer BW, Ferrer FA, Klinedinst DK, Rodriguez R (2000) A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Anal Biochem* 282:158-161
119. Eichmüller SB, Osen W, Mandelboim O, Seliger B (2017) Immune Modulatory microRNAs Involved in Tumor Attack and Tumor Immune Escape. *J Natl Cancer Inst* 109
120. Ekiz HA, Huffaker TB, Grossmann AH, Stephens WZ, Williams MA, Round JL, O'Connell RM (2019) MicroRNA-155 coordinates the immunological landscape within murine melanoma and correlates with immunity in human cancers. *JCI Insight* 4
121. Erhard F, Haas J, Lieber D, Malterer G, Jaskiewicz L, Zavolan M, Dolken L, Zimmer R (2014) Widespread context dependency of microRNA-mediated regulation. *Genome Res* 24:906-919
122. Faehnle CR, Joshua-Tor L (2007) Argonautes confront new small RNAs. *Curr Opin Chem Biol* 11:569-577
123. Fernandes Q (2017) MicroRNA: Defining a new niche in Leukemia. *Blood Rev* 31:129-138
124. Finnerty JR, Wang WX, Hebert SS, Wilfred BR, Mao G, Nelson PT (2010) The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases. *J Mol Biol* 402:491-509
125. Flamand MN, Gan HH, Mayya VK, Gunsalus KC, Duchaine TF (2017) A non-canonical site reveals the cooperative mechanisms of microRNA-mediated silencing. *Nucleic Acids Res* 45:7212-7225
126. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92-105
127. Fu X, Fu N, Guo S, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, Chen W, Li Y, Zeng R, Khaitovich P (2009) Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics. *BMC Genomics* 10:161
128. Fu X, Meng Z, Liang W, Tian Y, Wang X, Han W, Lou G, Wang X, Lou F, Yen Y, Yu H, Jove R, Huang W (2014) miR-26a enhances miRNA biogenesis by targeting Lin28B and Zcchc11 to suppress tumor growth and metastasis. *Oncogene* 33:4296-4306

6. Literaturverzeichnis

129. Fuller DM, Zhu M, Ou-Yang CW, Sullivan SA, Zhang W (2011) A tale of two TRAPs: LAT and LAB in the regulation of lymphocyte development, activation, and autoimmunity. *Immunol Res* 49:97-108
130. Fuziwara CS, Kimura ET (2015) Insights into Regulation of the miR-17-92 Cluster of miRNAs in Cancer. *Front Med (Lausanne)* 2:64
131. Gagnon JD, Kageyama R, Shehata HM, Fassett MS, Mar DJ, Wigton EJ, Johansson K, Litterman AJ, Odorizzi P, Simeonov D, Laidlaw BJ, Panduro M, Patel S, Jeker LT, Feeney ME, McManus MT, Marson A, Matloubian M, Sanjabi S, Ansel KM (2019) miR-15/16 Restrains Memory T Cell Differentiation, Cell Cycle, and Survival. *Cell Rep* 28:2169-2181 e2164
132. Garibyan L, Avashia N (2013) Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 133:1-4
133. Garzon R, Calin GA, Croce CM (2009) MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 60:167-179
134. Gebert LFR, MacRae IJ (2019) Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:21-37
135. Gegonne A, Devaiah BN, Singer DS (2013) TAF7: traffic controller in transcription initiation. *Transcription* 4:29-33
136. George-Gay B, Parker K (2003) Understanding the complete blood count with differential. *J Perianesth Nurs* 18:96-114; quiz 115-117
137. Gerstner N, Kehl T, Lenhof K, Muller A, Mayer C, Eckhart L, Grammes NL, Diener C, Hart M, Hahn O, Walter J, Wyss-Coray T, Meese E, Keller A, Lenhof HP (2020) GeneTrail 3: advanced high-throughput enrichment analysis. *Nucleic Acids Res* 48:W515-W520
138. Gilles ME, Slack FJ (2018) Let-7 microRNA as a potential therapeutic target with implications for immunotherapy. *Expert Opin Ther Targets* 22:929-939
139. Giri BR, Mahato RI, Cheng G (2019) Roles of microRNAs in T cell immunity: Implications for strategy development against infectious diseases. *Med Res Rev* 39:706-732
140. Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, Bertone P, Caldas C (2010) Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA* 16:991-1006
141. Golubovskaya V, Wu L (2016) Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 8
142. Govindarajan R, Duraiyan J, Kaliyappan K, Palanisamy M (2012) Microarray and its applications. *J Pharm Bioallied Sci* 4:S310-312
143. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74
144. Green MR, Sambrook J (2019) Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harb Protoc* 2019
145. Greenberg E, Hajdu S, Nemlich Y, Cohen R, Itzhaki O, Jacob-Hirsch J, Besser MJ, Schachter J, Markel G (2014) Differential regulation of aggressive features in melanoma cells by members of the miR-17-92 complex. *Open Biol* 4:140030
146. Greer LF, 3rd, Szalay AA (2002) Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* 17:43-74

6. Literaturverzeichnis

147. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123:631-640
148. Grigoryev YA, Kurian SM, Hart T, Nakorchevsky AA, Chen C, Campbell D, Head SR, Yates JR, 3rd, Salomon DR (2011) MicroRNA regulation of molecular networks mapped by global microRNA, mRNA, and protein expression in activated T lymphocytes. *J Immunol* 187:2233-2243
149. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27:91-105
150. Grivna ST, Beyret E, Wang Z, Lin H (2006) A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev* 20:1709-1714
151. Grötschel M, Wakabayashi Y (1989) A cutting plane algorithm for a clustering problem. *Mathematical Programming* 45:59-96
152. Gubler U, Hoffman BJ (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269
153. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE (2016) Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med* 14:143
154. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466:835-840
155. Guo J, Qu H, Chen Y, Xia J (2017) The role of RNA-binding protein tristetraprolin in cancer and immunity. *Med Oncol* 34:196
156. Guo L, Lu Z (2010) The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PLoS One* 5:e11387
157. Guo Y, Sheng Q, Li J, Ye F, Samuels DC, Shyr Y (2013) Large scale comparison of gene expression levels by microarrays and RNAseq using TCGA data. *PLoS One* 8:e71462
158. Gussow D, Clackson T (1989) Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 17:4000
159. Hamberg M, Backes C, Fehlmann T, Hart M, Meder B, Meese E, Keller A (2016) MiRTargetLink--miRNAs, Genes and Interaction Networks. *Int J Mol Sci* 17:564
160. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18:3016-3027
161. Hanna J, Hossain GS, Kocerha J (2019) The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Front Genet* 10:478
162. Hart M, Walch-Ruckheim B, Krammes L, Kehl T, Rheinheimer S, Tanzer T, Glombitza B, Sester M, Lenhof HP, Keller A, Meese E (2019) miR-34a as hub of T cell regulation networks. *J Immunother Cancer* 7:187
163. Hart M, Nickl L, Walch-Rueckheim B, Krammes L, Rheinheimer S, Diener C, Taenzer T, Kehl T, Sester M, Lenhof HP, Keller A, Meese E (2020) Wrinkle in the plan: miR-34a-5p impacts chemokine signaling by modulating CXCL10/CXCL11/CXCR3-axis in CD4(+), CD8(+) T cells, and M1 macrophages. *J Immunother Cancer* 8
164. He HJ, Stein EV, DeRose P, Cole KD (2018) Limitations of methods for measuring the concentration of human genomic DNA and oligonucleotide samples. *Biotechniques* 64:59-68

6. Literaturverzeichnis

165. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435:828-833
166. He M, Liu Y, Wang X, Zhang MQ, Hannon GJ, Huang ZJ (2012) Cell-type-based analysis of microRNA profiles in the mouse brain. *Neuron* 73:35-48
167. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-994
168. Hess K, Yang Y, Golech S, Sharov A, Becker KG, Weng NP (2004) Kinetic assessment of general gene expression changes during human naive CD4+ T cell activation. *Int Immunol* 16:1711-1721
169. Hewitt EW (2003) The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* 110:163-169
170. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59
171. Hochrainer K, Pejanovic N, Olaseun VA, Zhang S, Iadecola C, Anrather J (2015) The ubiquitin ligase HERC3 attenuates NF-kappaB-dependent transcription independently of its enzymatic activity by delivering the RelA subunit for degradation. *Nucleic Acids Res* 43:9889-9904
172. Hoffman LM, Jendrisak J (1990) Heat-labile phosphatase simplifies the preparation of dephosphorylated vector DNA. *Gene* 88:97-99
173. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G (2016a) B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol* 11:137-154
174. Hoffman Y, Bublik DR, Ugalde AP, Elkon R, Biniashvili T, Agami R, Oren M, Pilpel Y (2016b) 3'UTR Shortening Potentiates MicroRNA-Based Repression of Pro-differentiation Genes in Proliferating Human Cells. *PLoS Genet* 12:e1005879
175. Hofmann MA, Brian DA (1993) Sequencing DNA amplified directly from a bacterial colony. *Methods Mol Biol* 15:205-210
176. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7276-7280
177. Hong DS, Kang YK, Borad M, Sachdev J, Ejadi S, Lim HY, Brenner AJ, Park K, Lee JL, Kim TY, Shin S, Becerra CR, Falchook G, Stoudemire J, Martin D, Kelnar K, Peltier H, Bonato V, Bader AG, Smith S, Kim S, O'Neill V, Beg MS (2020) Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 122:1630-1637
178. Hoseini SS, Sauer MG (2015) Molecular cloning using polymerase chain reaction, an educational guide for cellular engineering. *J Biol Eng* 9:2
179. Hotchkiss RD, Gabor M (1970) Bacterial transformation, with special reference to recombination process. *Annu Rev Genet* 4:193-224
180. Hsin JP, Lu Y, Loeb GB, Leslie CS, Rudensky AY (2018) The effect of cellular context on miR-155-mediated gene regulation in four major immune cell types. *Nat Immunol* 19:1137-1145
181. Hu HY, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, Zhou YH, Chen W, Khaitovich P (2009) Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* 10:413

6. Literaturverzeichnis

182. Huang TC, Pinto SM, Pandey A (2013a) Proteomics for understanding miRNA biology. *Proteomics* 13:558-567
183. Huang W (2017) MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics. *Methods Mol Biol* 1617:57-67
184. Huang Y, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ, Shen XJ (2011) The discovery approaches and detection methods of microRNAs. *Mol Biol Rep* 38:4125-4135
185. Huang Y, Zhang JL, Yu XL, Xu TS, Wang ZB, Cheng XC (2013b) Molecular functions of small regulatory noncoding RNA. *Biochemistry (Mosc)* 78:221-230
186. Hung MC, Wensink PC (1984) Different restriction enzyme-generated sticky DNA ends can be joined in vitro. *Nucleic Acids Res* 12:1863-1874
187. Hunter MC, Teijeira A, Halin C (2016) T Cell Trafficking through Lymphatic Vessels. *Front Immunol* 7:613
188. Incorvaia L, Fanale D, Badalamenti G, Brando C, Bono M, De Luca I, Algeri L, Bonasera A, Corsini LR, Scurria S, Iovanna JL, Russo A, Bazan V (2020) A "Lymphocyte MicroRNA Signature" as Predictive Biomarker of Immunotherapy Response and Plasma PD-1/PD-L1 Expression Levels in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Pointing towards Epigenetic Reprogramming. *Cancers (Basel)* 12
189. Islam S, Kjallquist U, Moliner A, Zajac P, Fan JB, Lonnerberg P, Linnarsson S (2011) Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res* 21:1160-1167
190. Jackstadt R, Hermeking H (2015) MicroRNAs as regulators and mediators of c-MYC function. *Biochim Biophys Acta* 1849:544-553
191. Janas MM, Wang B, Harris AS, Aguiar M, Shaffer JM, Subrahmanyam YV, Behlke MA, Wucherpfennig KW, Gygi SP, Gagnon E, Novina CD (2012) Alternative RISC assembly: binding and repression of microRNA-mRNA duplexes by human Ago proteins. *RNA* 18:2041-2055
192. Janeway CA, Jr., Sharrow SO, Simpson E (1975) T-cell populations with different functions. *Nature* 253:544-546
193. Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216
194. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patack AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, Hodges MR (2013) Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 368:1685-1694
195. Jayaswal V, Lutherborrow M, Ma DD, Hwa Yang Y (2009) Identification of microRNAs with regulatory potential using a matched microRNA-mRNA time-course data. *Nucleic Acids Res* 37:e60
196. Jeker LT, Bluestone JA (2013) MicroRNA regulation of T-cell differentiation and function. *Immunol Rev* 253:65-81
197. Jelley-Gibbs DM, Lepak NM, Yen M, Swain SL (2000) Two distinct stages in the transition from naive CD4 T cells to effectors, early antigen-dependent and late cytokine-driven expansion and differentiation. *J Immunol* 165:5017-5026
198. Ji Y, Hocker JD, Gattinoni L (2016) Enhancing adoptive T cell immunotherapy with microRNA therapeutics. *Semin Immunol* 28:45-53

6. Literaturverzeichnis

199. Ji Y, Fioravanti J, Zhu W, Wang H, Wu T, Hu J, Lacey NE, Gautam S, Le Gall JB, Yang X, Hocker JD, Escobar TM, He S, Dell'Orso S, Hawk NV, Kapoor V, Telford WG, Di Croce L, Muljo SA, Zhang Y, Sartorelli V, Gattinoni L (2019) miR-155 harnesses Phf19 to potentiate cancer immunotherapy through epigenetic reprogramming of CD8(+) T cell fate. *Nat Commun* 10:2157
200. Jia Y, Wei Y (2020) Modulators of MicroRNA Function in the Immune System. *Int J Mol Sci* 21
201. Jiang P, Collier H (2012) Functional interactions between microRNAs and RNA binding proteins. *Microna* 1:70-79
202. Juzenas S, Venkatesh G, Hubenthal M, Hoepfner MP, Du ZG, Paulsen M, Rosenstiel P, Senger P, Hofmann-Apitius M, Keller A, Kupcinskis L, Franke A, Hemmrich-Stanisak G (2017) A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral blood. *Nucleic Acids Res* 45:9290-9301
203. Kaczowski B, Torarinsson E, Reiche K, Havgaard JH, Stadler PF, Gorodkin J (2009) Structural profiles of human miRNA families from pairwise clustering. *Bioinformatics* 25:291-294
204. Keller A, Backes C, Lenhof HP (2007) Computation of significance scores of unweighted Gene Set Enrichment Analyses. *BMC Bioinformatics* 8:290
205. Kerkhoven RM, Sie D, Nieuwland M, Heimerikx M, De Ronde J, Brugman W, Velds A (2008) The T7-primer is a source of experimental bias and introduces variability between microarray platforms. *PLoS One* 3:e1980
206. Kern F, Backes C, Hirsch P, Fehlmann T, Hart M, Meese E, Keller A (2020) What's the target: understanding two decades of in silico microRNA-target prediction. *Brief Bioinform* 21:1999-2010
207. Kern F, Krammes L, Danz K, Diener C, Kehl T, Kuchler O, Fehlmann T, Kahraman M, Rheinheimer S, Aparicio-Puerta E, Wagner S, Ludwig N, Backes C, Lenhof HP, von Briesen H, Hart M, Keller A, Meese E (2021) Validation of human microRNA target pathways enables evaluation of target prediction tools. *Nucleic Acids Res* 49:127-144
208. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 39:1278-1284
209. Kesharwani P, Banerjee S, Gupta U, Amin MCIM, Padhye S, Sarkar FH, Iyer AK (2015) PAMAM dendrimers as promising nanocarriers for RNAi therapeutics. *Materials Today* 18:565-572
210. Khabar KS (2007) Rapid transit in the immune cells: the role of mRNA turnover regulation. *J Leukoc Biol* 81:1335-1344
211. Khan AA, Betel D, Miller ML, Sander C, Leslie CS, Marks DS (2009) Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol* 27:549-555
212. Khuu C, Utheim TP, Sehic A (2016) The Three Paralogous MicroRNA Clusters in Development and Disease, miR-17-92, miR-106a-363, and miR-106b-25. *Scientifica (Cairo)* 2016:1379643
213. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115:209-216
214. Kiang KM, Leung GK (2018) A Review on Adducin from Functional to Pathological Mechanisms: Future Direction in Cancer. *Biomed Res Int* 2018:3465929
215. Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, Lee EK, Martindale JL, Gorospe M (2009) HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev* 23:1743-1748
216. Kim YK, Kim VN (2007) Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* 26:775-783

217. Kleiboeker SB (2005) Quantitative assessment of the effect of uracil-DNA glycosylase on amplicon DNA degradation and RNA amplification in reverse transcription-PCR. *Virology* 2:29
218. Kleiveland CR (2015). Peripheral Blood Mononuclear Cells. In *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, Verhoeckx K, P Cotter, I Lopez-Exposito, C Kleiveland, T Lea, A Mackie, T Requena, D Swiatecka, H Wichers, eds. (Cham (CH)), pp. 161-167.
219. Kopp KL, Ralfkiaer U, Gjerdrum LM, Helvad R, Pedersen IH, Litman T, Jonson L, Hagedorn PH, Krejsgaard T, Gniadecki R, Bonefeld CM, Skov L, Geisler C, Wasik MA, Ralfkiaer E, Odum N, Woetmann A (2013) STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma. *Cell Cycle* 12:1939-1947
220. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT (2009) Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137:1005-1017
221. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42:D68-73
222. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 47:D155-D162
223. Krause JR, Boggs DR (1987) Search for eosinopenia in hospitalized patients with normal blood leukocyte concentration. *Am J Hematol* 24:55-63
224. Krichevsky AM, Gabriely G (2009) miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* 13:39-53
225. Kroesen BJ, Teteloshvili N, Smigielska-Czepiel K, Brouwer E, Boots AM, van den Berg A, Kluiver J (2015) Immuno-miRs: critical regulators of T-cell development, function and ageing. *Immunology* 144:1-10
226. Kuhn DE, Martin MM, Feldman DS, Terry AV, Jr., Nuovo GJ, Elton TS (2008) Experimental validation of miRNA targets. *Methods* 44:47-54
227. Kumar P, Luo Y, Tudela C, Alexander JM, Mendelson CR (2013) The c-Myc-regulated microRNA-17~92 (miR-17~92) and miR-106a~363 clusters target hCYP19A1 and hGCM1 to inhibit human trophoblast differentiation. *Mol Cell Biol* 33:1782-1796
228. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T (2011) Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol* 8:706-713
229. Kundu P, Fabian MR, Sonenberg N, Bhattacharyya SN, Filipowicz W (2012) HuR protein attenuates miRNA-mediated repression by promoting miRISC dissociation from the target RNA. *Nucleic Acids Res* 40:5088-5100
230. Kverneland AH, Streit M, Geissler E, Hutchinson J, Vogt K, Boes D, Niemann N, Pedersen AE, Schlickeiser S, Sawitzki B (2016) Age and gender leucocytes variances and references values generated using the standardized ONE-Study protocol. *Cytometry A* 89:543-564
231. Lai X, Eberhardt M, Schmitz U, Vera J (2019) Systems biology-based investigation of cooperating microRNAs as monotherapy or adjuvant therapy in cancer. *Nucleic Acids Res* 47:7753-7766
232. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*
233. Lee T, Wang N, Houel S, Coutts K, Old W, Ahn N (2015a) Dosage and temporal thresholds in microRNA proteomics. *Mol Cell Proteomics* 14:289-302

6. Literaturverzeichnis

234. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21:4663-4670
235. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-419
236. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23:4051-4060
237. Lee YJ, Kim V, Muth DC, Witwer KW (2015b) Validated MicroRNA Target Databases: An Evaluation. *Drug Dev Res* 76:389-396
238. Lefever S, Hellemans J, Pattyn F, Przybylski DR, Taylor C, Geurts R, Untergasser A, Vandesompele J, consortium R (2009) RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37:2065-2069
239. Lehman IR (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* 186:790-797
240. Lemus-Diaz N, Boker KO, Rodriguez-Polo I, Mitter M, Preis J, Arlt M, Gruber J (2017) Dissecting miRNA gene repression on single cell level with an advanced fluorescent reporter system. *Sci Rep* 7:45197
241. Leshkowitz D, Horn-Saban S, Parmet Y, Feldmesser E (2013) Differences in microRNA detection levels are technology and sequence dependent. *RNA* 19:527-538
242. Li MO, Flavell RA (2008) TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 134:392-404
243. Li S, He X, Gan Y, Zhang J, Gao F, Lin L, Qiu X, Yu T, Zhang X, Chen P, Tong J, Qian W, Xu Y (2021) Targeting miR-21 with NL101 blocks c-Myc/Mxd1 loop and inhibits the growth of B cell lymphoma. *Theranostics* 11:3439-3451
244. Li X, Wu Y, Zhang L, Cao Y, Li Y, Li J, Zhu L, Wu G (2014) Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem* 451:18-24
245. Li X, Ben-Dov IZ, Mauro M, Williams Z (2015) Lowering the quantification limit of the QubitTM RNA HS assay using RNA spike-in. *BMC Mol Biol* 16:9
246. Lie YS, Petropoulos CJ (1998) Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Curr Opin Biotechnol* 9:43-48
247. Lin F, Morrison JM, Wu W, Worman HJ (2005) MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Hum Mol Genet* 14:437-445
248. Lin R, Chen L, Chen G, Hu C, Jiang S, Sevilla J, Wan Y, Sampson JH, Zhu B, Li QJ (2014) Targeting miR-23a in CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes prevents tumor-dependent immunosuppression. *J Clin Invest* 124:5352-5367
249. Lind EF, Ohashi PS (2014) Mir-155, a central modulator of T-cell responses. *Eur J Immunol* 44:11-15
250. Lindsten T, June CH, Thompson CB (1988) Multiple mechanisms regulate c-myc gene expression during normal T cell activation. *EMBO J* 7:2787-2794
251. Liu B, Li J, Cairns MJ (2014) Identifying miRNAs, targets and functions. *Brief Bioinform* 15:1-19
252. Liu J, Sisk JM, Gama L, Clements JE, Witwer KW (2013a) Tristetraprolin expression and microRNA-mediated regulation during simian immunodeficiency virus infection of the central nervous system. *Mol Brain* 6:40

6. Literaturverzeichnis

253. Liu J, Wu CP, Lu BF, Jiang JT (2013b) Mechanism of T cell regulation by microRNAs. *Cancer Biol Med* 10:131-137
254. London CA, Lodge MP, Abbas AK (2000) Functional responses and costimulator dependence of memory CD4⁺ T cells. *J Immunol* 164:265-272
255. Long H, Wang X, Chen Y, Wang L, Zhao M, Lu Q (2018) Dysregulation of microRNAs in autoimmune diseases: Pathogenesis, biomarkers and potential therapeutic targets. *Cancer Lett* 428:90-103
256. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL (1990) Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125-128
257. Lopez-Cabrera M, Santis AG, Fernandez-Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sanchez-Mateos P, Sanchez-Madrid F (1993) Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med* 178:537-547
258. Lopez-Romero P, Gonzalez MA, Callejas S, Dopazo A, Irizarry RA (2010) Processing of Agilent microRNA array data. *BMC Res Notes* 3:18
259. Lorenz WW, McCann RO, Longiaru M, Cormier MJ (1991) Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4438-4442
260. Lorenzi JC, Brum DG, Zanette DL, de Paula Alves Souza A, Barbuzano FG, Dos Santos AC, Barreira AA, da Silva WA (2012) miR-15a and 16-1 are downregulated in CD4⁺ T cells of multiple sclerosis relapsing patients. *Int J Neurosci* 122:466-471
261. Luck ME, Muljo SA, Collins CB (2015) Prospects for Therapeutic Targeting of MicroRNAs in Human Immunological Diseases. *J Immunol* 194:5047-5052
262. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B (2012) CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 2012:925135
263. Ludwig N, Becker M, Schumann T, Speer T, Fehlmann T, Keller A, Meese E (2017) Bias in recent miRBase annotations potentially associated with RNA quality issues. *Sci Rep* 7:5162
264. Lykke-Andersen J, Wagner E (2005) Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev* 19:351-361
265. Makalowski W (2001) The human genome structure and organization. *Acta Biochim Pol* 48:587-598
266. Mandel M, Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53:159-162
267. Mantele W, Deniz E (2017) UV-VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 173:965-968
268. Mao L, Liu S, Hu L, Jia L, Wang H, Guo M, Chen C, Liu Y, Xu L (2018) miR-30 Family: A Promising Regulator in Development and Disease. *Biomed Res Int* 2018:9623412
269. Marbach-Bar N, Ben-Noon A, Ashkenazi S, Tamarkin-Ben Harush A, Avnit-Sagi T, Walker MD, Dikstein R (2013) Disparity between microRNA levels and promoter strength is associated with initiation rate and Pol II pausing. *Nat Commun* 4:2118
270. Marchingo JM, Sinclair LV, Howden AJ, Cantrell DA (2020) Quantitative analysis of how Myc controls T cell proteomes and metabolic pathways during T cell activation. *Elife* 9

6. Literaturverzeichnis

271. Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D (2008) Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell* 32:503-518
272. Marin RM, Vanicek J (2011) Efficient use of accessibility in microRNA target prediction. *Nucleic Acids Res* 39:19-29
273. Marinov GK, Williams BA, McCue K, Schroth GP, Gertz J, Myers RM, Wold BJ (2014) From single-cell to cell-pool transcriptomes: stochasticity in gene expression and RNA splicing. *Genome Res* 24:496-510
274. Marofi F, Tahmasebi S, Rahman HS, Kaigorodov D, Markov A, Yumashev AV, Shomali N, Chartrand MS, Pathak Y, Mohammed RN, Jarahian M, Motavalli R, Motavalli Khiavi F (2021) Any closer to successful therapy of multiple myeloma? CAR-T cell is a good reason for optimism. *Stem Cell Res Ther* 12:217
275. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL (2018) An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* 14:49
276. Marzi MJ, Ghini F, Cerruti B, de Pretis S, Bonetti P, Giacomelli C, Gorski MM, Kress T, Pelizzola M, Muller H, Amati B, Nicassio F (2016) Degradation dynamics of microRNAs revealed by a novel pulse-chase approach. *Genome Res* 26:554-565
277. Mashima R (2015) Physiological roles of miR-155. *Immunology* 145:323-333
278. Masopust D, Vezys V, Wherry EJ, Ahmed R (2007) A brief history of CD8 T cells. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1:S103-110
279. Masotti A, Preckel T (2006) Analysis of small RNAs with the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Nature Methods* 3:658-658
280. Mathern DR, Heeger PS (2015) Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin J Am Soc Nephrol* 10:1636-1650
281. Matter A (1974) The differentiation pathway of T lymphocytes. Evidence for two differentiated cell types. *J Exp Med* 140:566-577
282. Maus MV, Fraietta JA, Levine BL, Kalos M, Zhao Y, June CH (2014) Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annu Rev Immunol* 32:189-225
283. Mayr C, Bartel DP (2009) Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 138:673-684
284. Mayya VK, Duchaine TF (2015) On the availability of microRNA-induced silencing complexes, saturation of microRNA-binding sites and stoichiometry. *Nucleic Acids Res* 43:7556-7565
285. McCarthy BJ, Church RB (1970) The specificity of molecular hybridization reactions. *Annu Rev Biochem* 39:131-150
286. McCarthy DJ, Smyth GK (2009) Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics* 25:765-771
287. Medley JC, Panzade G, Zinovyeva AY (2021) microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 12:e1627
288. Mehta A, Baltimore D (2016) MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat Rev Immunol* 16:279-294

6. Literaturverzeichnis

289. Meijer HA, Smith EM, Bushell M (2014) Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans* 42:1135-1140
290. Mertz JE, Davis RW (1972) Cleavage of DNA by R 1 restriction endonuclease generates cohesive ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:3370-3374
291. Mestas J, Hughes CC (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172:2731-2738
292. Michlewski G, Guil S, Semple CA, Caceres JF (2008) Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol Cell* 32:383-393
293. Miranda JA, Steward GF (2017) Variables influencing the efficiency and interpretation of reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR): An empirical study using Bacteriophage MS2. *J Virol Methods* 241:1-10
294. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, Bernad A, Sanchez-Madrid F (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2:282
295. Molon B, Cali B, Viola A (2016) T Cells and Cancer: How Metabolism Shapes Immunity. *Front Immunol* 7:20
296. Monaco G, Lee B, Xu W, Mustafah S, Hwang YY, Carre C, Burdin N, Visan L, Ceccarelli M, Poidinger M, Zippelius A, Pedro de Magalhaes J, Larbi A (2019) RNA-Seq Signatures Normalized by mRNA Abundance Allow Absolute Deconvolution of Human Immune Cell Types. *Cell Rep* 26:1627-1640 e1627
297. Mond JJ, Takahashi T, Thorbecke GJ (1972) Surface antigens of immunocompetent cells. 3. In vitro studies of the role of B and T cells in immunological memory. *J Exp Med* 136:663-675
298. Moon SY, Zheng Y (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 13:13-22
299. Moore MJ, Blachere NE, Fak JJ, Park CY, Sawicka K, Parveen S, Zucker-Scharff I, Moltedo B, Rudensky AY, Darnell RB (2018) ZFP36 RNA-binding proteins restrain T cell activation and anti-viral immunity. *Elife* 7
300. Moser B, Willmann K (2004) Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* 63 Suppl 2:ii84-ii89
301. Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R, Ilsley D (2000) A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* 21:128-134
302. Mukaka MM (2012) Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J* 24:69-71
303. Muljo SA, Ansel KM, Kanellopoulou C, Livingston DM, Rao A, Rajewsky K (2005) Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J Exp Med* 202:261-269
304. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
305. Mullokandov G, Baccarini A, Ruzo A, Jayaprakash AD, Tung N, Israelow B, Evans MJ, Sachidanandam R, Brown BD (2012) High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. *Nat Methods* 9:840-846

6. Literaturverzeichnis

306. Naifang S, Minping Q, Minghua D (2013) Integrative Approaches for microRNA Target Prediction: Combining Sequence Information and the Paired mRNA and miRNA Expression Profiles. *Curr Bioinform* 8:37-45
307. Nakanishi K (2016) Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip Rev RNA* 7:637-660
308. Nam JW, Rissland OS, Koppstein D, Abreu-Goodger C, Jan CH, Agarwal V, Yildirim MA, Rodriguez A, Bartel DP (2014) Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting. *Mol Cell* 53:1031-1043
309. Nam S, Li M, Choi K, Balch C, Kim S, Nephew KP (2009) MicroRNA and mRNA integrated analysis (MMIA): a web tool for examining biological functions of microRNA expression. *Nucleic Acids Res* 37:W356-362
310. Narayan N, Morenos L, Phipson B, Willis SN, Brumatti G, Eggers S, Lalaoui N, Brown LM, Kosasih HJ, Bartolo RC, Zhou L, Catchpoole D, Saffery R, Oshlack A, Goodall GJ, Ekert PG (2017) Functionally distinct roles for different miR-155 expression levels through contrasting effects on gene expression, in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 31:808-820
311. Newton K, Dixit VM (2012) Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4
312. Ngo TD, Partin AC, Nam Y (2019) RNA Specificity and Autoregulation of DDX17, a Modulator of MicroRNA Biogenesis. *Cell Rep* 29:4024-4035 e4025
313. Nicholson LB (2016) The immune system. *Essays Biochem* 60:275-301
314. Noble PB, Cutts JH (1967) Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *Can Vet J* 8:110-111
315. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C (2018) Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:402
316. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435:839-843
317. Obbard DJ, Gordon KH, Buck AH, Jiggins FM (2009) The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:99-115
318. Oh H, Ghosh S (2013) NF-kappaB: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev* 252:41-51
319. Oh M, Rhee S, Moon JH, Chae H, Lee S, Kang J, Kim S (2017) Literature-based condition-specific miRNA-mRNA target prediction. *PLoS One* 12:e0174999
320. Oh SA, Li MO (2013) TGF-beta: guardian of T cell function. *J Immunol* 191:3973-3979
321. Ohno M, Ohkuri T, Kosaka A, Tanahashi K, June CH, Natsume A, Okada H (2013) Expression of miR-17-92 enhances anti-tumor activity of T-cells transduced with the anti-EGFRvIII chimeric antigen receptor in mice bearing human GBM xenografts. *J Immunother Cancer* 1:21
322. Okayama H, Berg P (1982) High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol Cell Biol* 2:161-170
323. Olive V, Jiang I, He L (2010) miR-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1348-1354
324. Ollila J, Vihinen M (2005) B cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37:518-523

6. Literaturverzeichnis

325. Olson ND, Morrow JB (2012) DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Res Notes* 5:668
326. Otsuka H, Fukao A, Funakami Y, Duncan KE, Fujiwara T (2019) Emerging Evidence of Translational Control by AU-Rich Element-Binding Proteins. *Front Genet* 10:332
327. Pan CY, Kuo WT, Chiu CY, Lin WC (2017) Visual Display of 5p-arm and 3p-arm miRNA Expression with a Mobile Application. *Biomed Res Int* 2017:6037168
328. Pan D, Estevez-Salmeron LD, Stroschein SL, Zhu X, He J, Zhou S, Luo K (2005) The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad proteins to repress signaling by the transforming growth factor- β superfamily of cytokines. *J Biol Chem* 280:15992-16001
329. Park JH, Shin C (2017) Non-canonical targets play an important role in microRNA stability control mechanisms. *BMB Rep* 50:158-159
330. Park JH, Shin SY, Shin C (2017) Non-canonical targets destabilize microRNAs in human Argonautes. *Nucleic Acids Res* 45:1569-1583
331. Parrish S, Fleenor J, Xu S, Mello C, Fire A (2000) Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell* 6:1077-1087
332. Paul S, Bravo Vazquez LA, Perez Uribe S, Roxana Reyes-Perez P, Sharma A (2020) Current Status of microRNA-Based Therapeutic Approaches in Neurodegenerative Disorders. *Cells* 9
333. Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, Wende W (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:685-707
334. Podshivalova K, Salomon DR (2013) MicroRNA regulation of T-lymphocyte immunity: modulation of molecular networks responsible for T-cell activation, differentiation, and development. *Crit Rev Immunol* 33:435-476
335. Pollizzi KN, Powell JD (2014) Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. *Nat Rev Immunol* 14:435-446
336. Poulton TA, Gallagher A, Potts RC, Beck JS (1988) Changes in activation markers and cell membrane receptors on human peripheral blood T lymphocytes during cell cycle progression after PHA stimulation. *Immunology* 64:419-425
337. Prazeres DM, Schluep T, Cooney C (1998) Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *J Chromatogr A* 806:31-45
338. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M (2012) MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* 13:358-369
339. Raghavan A, Ogilvie RL, Reilly C, Abelson ML, Raghavan S, Vasdewani J, Krathwohl M, Bohjanen PR (2002) Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes. *Nucleic Acids Res* 30:5529-5538
340. Rio DC, Clark SG, Tjian R (1985) A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction. *Science* 227:23-28
341. Rio DC, Ares M, Jr., Hannon GJ, Nilsen TW (2010) Nondenaturing agarose gel electrophoresis of RNA. *Cold Spring Harb Protoc* 2010:pdb prot5445
342. Riolo G, Cantara S, Marzocchi C, Ricci C (2020) miRNA Targets: From Prediction Tools to Experimental Validation. *Methods Protoc* 4

6. Literaturverzeichnis

343. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43:e47
344. Roberts RJ (1982) Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res* 10:r117-144
345. Robinson WH, Lindstrom TM, Cheung RK, Sokolove J (2013) Mechanistic biomarkers for clinical decision making in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 9:267-276
346. Rock KL, Reits E, Neefjes J (2016) Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol* 37:724-737
347. Rodriguez-Galan A, Fernandez-Messina L, Sanchez-Madrid F (2018) Control of Immunoregulatory Molecules by miRNAs in T Cell Activation. *Front Immunol* 9:2148
348. Rodriguez-Galan A, Dosil SG, Gomez MJ, Fernandez-Delgado I, Fernandez-Messina L, Sanchez-Cabo F, Sanchez-Madrid F (2021) MiRNA post-transcriptional modification dynamics in T cell activation. *iScience* 24:102530
349. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A (2007) Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316:608-611
350. Rojo Arias JE, Busskamp V (2019) Challenges in microRNAs' targetome prediction and validation. *Neural Regen Res* 14:1672-1677
351. Romano G, Veneziano D, Acunzo M, Croce CM (2017) Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis* 38:485-491
352. Rosado M, Silva R, M GB, J GJ, Manadas B, Anjo SI (2019) Advances in biomarker detection: Alternative approaches for blood-based biomarker detection. *Adv Clin Chem* 92:141-199
353. Rupaimoole R, Slack FJ (2017) MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 16:203-222
354. Sah S, McCall MN, Eveleigh D, Wilson M, Irizarry RA (2010) Performance evaluation of commercial miRNA expression array platforms. *BMC Res Notes* 3:80
355. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
356. Saki N, Abroun S, Soleimani M, Hajizamani S, Shahjahani M, Kast RE, Mortazavi Y (2015) Involvement of MicroRNA in T-Cell Differentiation and Malignancy. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 9:33-49
357. Salmeron A, Borroto A, Fresno M, Crumpton MJ, Ley SC, Alarcon B (1995) Transferrin receptor induces tyrosine phosphorylation in T cells and is physically associated with the TCR zeta-chain. *J Immunol* 154:1675-1683
358. Salvi V, Gianello V, Tiberio L, Sozzani S, Bosisio D (2019) Cytokine Targeting by miRNAs in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 10:15
359. Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB (2008) Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* 320:1643-1647

360. Sandhu GS, Precup JW, Kline BC (1989) Rapid one-step characterization of recombinant vectors by direct analysis of transformed *Escherichia coli* colonies. *Biotechniques* 7:689-690
361. Sasagawa Y, Nikaido I, Hayashi T, Danno H, Uno KD, Imai T, Ueda HR (2013) Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol* 14:R31
362. Schanen BC, Li X (2011) Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. *Genomics* 97:1-6
363. Scherm MG, Daniel C (2020) miRNA Regulation of T Cells in Islet Autoimmunity and Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep* 20:41
364. Schmidt DM, Ernst JD (1995) A fluorometric assay for the quantification of RNA in solution with nanogram sensitivity. *Anal Biochem* 232:144-146
365. Schmidt V, Subkhangulova A, Willnow TE (2017) Sorting receptor SORLA: cellular mechanisms and implications for disease. *Cell Mol Life Sci* 74:1475-1483
366. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19:621-626
367. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:3
368. Schwanhausser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473:337-342
369. Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455:58-63
370. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, Lopez CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG, Inflammation, Host Response to Injury LSCRP (2013) Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:3507-3512
371. Seven M, Karatas OF, Duz MB, Ozen M (2014) The role of miRNAs in cancer: from pathogenesis to therapeutic implications. *Future Oncol* 10:1027-1048
372. Shah MY, Ferrajoli A, Sood AK, Lopez-Berestein G, Calin GA (2016) microRNA Therapeutics in Cancer - An Emerging Concept. *EBioMedicine* 12:34-42
373. Sharpe AH, Abbas AK (2006) T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med* 355:973-975
374. Sheedy FJ (2015) Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol* 6:19
375. Sheu-Gruttadauria J, Pawlica P, Klum SM, Wang S, Yario TA, Schirle Oakdale NT, Steitz JA, MacRae IJ (2019a) Structural Basis for Target-Directed MicroRNA Degradation. *Mol Cell* 75:1243-1255 e1247

6. Literaturverzeichnis

376. Sheu-Gruttadauria J, Xiao Y, Gebert LF, MacRae IJ (2019b) Beyond the seed: structural basis for supplementary microRNA targeting by human Argonaute2. *EMBO J* 38:e101153
377. Shigeyasu K, Toden S, Zumwalt TJ, Okugawa Y, Goel A (2017) Emerging Role of MicroRNAs as Liquid Biopsy Biomarkers in Gastrointestinal Cancers. *Clin Cancer Res* 23:2391-2399
378. Shin VY, Jin H, Ng EK, Cheng AS, Chong WW, Wong CY, Leung WK, Sung JJ, Chu KM (2011) NF-kappaB targets miR-16 and miR-21 in gastric cancer: involvement of prostaglandin E receptors. *Carcinogenesis* 32:240-245
379. Shu J, Xia Z, Li L, Liang ET, Slipek N, Shen D, Foo J, Subramanian S, Steer CJ (2012) Dose-dependent differential mRNA target selection and regulation by let-7a-7f and miR-17-92 cluster microRNAs. *RNA Biol* 9:1275-1287
380. Shu J, Silva B, Gao T, Xu Z, Cui J (2017) Dynamic and Modularized MicroRNA Regulation and Its Implication in Human Cancers. *Sci Rep* 7:13356
381. Siddika T, Heinemann IU (2020) Bringing MicroRNAs to Light: Methods for MicroRNA Quantification and Visualization in Live Cells. *Front Bioeng Biotechnol* 8:619583
382. Sirinian MI, Belleudi F, Campagna F, Ceridono M, Garofalo T, Quagliarini F, Verna R, Calandra S, Bertolini S, Sorice M, Torrisi MR, Arca M (2005) Adaptor protein ARH is recruited to the plasma membrane by low density lipoprotein (LDL) binding and modulates endocytosis of the LDL/LDL receptor complex in hepatocytes. *J Biol Chem* 280:38416-38423
383. Smigielska-Czepiel K, van den Berg A, Jellema P, Slezak-Prochazka I, Maat H, van den Bos H, van der Lei RJ, Kluiver J, Brouwer E, Boots AM, Kroesen BJ (2013) Dual role of miR-21 in CD4+ T-cells: activation-induced miR-21 supports survival of memory T-cells and regulates CCR7 expression in naive T-cells. *PLoS One* 8:e76217
384. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS (2009) T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27:591-619
385. Smith DR (1993) Agarose gel electrophoresis. *Methods Mol Biol* 18:433-438
386. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, Riddell SR (2016) Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia* 30:492-500
387. Song Y, Kilburn D, Song JH, Cheng Y, Saeui CT, Cheung DG, Croce CM, Yarema KJ, Meltzer SJ, Liu KJ, Wang TH (2017) Determination of absolute expression profiles using multiplexed miRNA analysis. *PLoS One* 12:e0180988
388. Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A (2008) MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* 18:131-140
389. Spiering MJ (2015) Primer on the Immune System. *Alcohol Res* 37:171-175
390. Stables J, Scott S, Brown S, Roelant C, Burns D, Lee MG, Rees S (1999) Development of a dual glow-signal firefly and Renilla luciferase assay reagent for the analysis of G-protein coupled receptor signalling. *J Recept Signal Transduct Res* 19:395-410
391. Stepanenko AA, Dmitrenko VV (2015) HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene* 569:182-190

6. Literaturverzeichnis

392. Stephen LA, ElMaghloob Y, McIlwraith MJ, Yelland T, Castro Sanchez P, Roda-Navarro P, Ismail S (2018) The Ciliary Machinery Is Repurposed for T Cell Immune Synapse Trafficking of LCK. *Dev Cell* 47:122-132 e124
393. Stockel D, Kehl T, Trampert P, Schneider L, Backes C, Ludwig N, Gerasch A, Kaufmann M, Gessler M, Graf N, Meese E, Keller A, Lenhof HP (2016) Multi-omics enrichment analysis using the GeneTrail2 web service. *Bioinformatics* 32:1502-1508
394. Strimbu K, Tavel JA (2010) What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 5:463-466
395. Strober W (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol Appendix* 3:Appendix 3B
396. Sun S, Sun P, Wang C, Sun T (2014) Downregulation of microRNA-155 accelerates cell growth and invasion by targeting c-myc in human gastric carcinoma cells. *Oncol Rep* 32:951-956
397. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M (2015) How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif* 3:9-16
398. Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, Ferbeyre G, Chartrand P (2007) An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem* 282:2135-2143
399. t Hoen PA, Ariyurek Y, Thygesen HH, Vreugdenhil E, Vossen RH, de Menezes RX, Boer JM, van Ommen GJ, den Dunnen JT (2008) Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms. *Nucleic Acids Res* 36:e141
400. Tahmasebi S, Elahi R, Esmailzadeh A (2019) Solid Tumors Challenges and New Insights of CAR T Cell Engineering. *Stem Cell Rev Rep* 15:619-636
401. Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, Hannon GJ (2008) Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453:534-538
402. Tan EK, Chao YX, West A, Chan LL, Poewe W, Jankovic J (2020) Parkinson disease and the immune system - associations, mechanisms and therapeutics. *Nat Rev Neurol* 16:303-318
403. Tan SC, Yiap BC (2009) DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol* 2009:574398
404. Tan W, Li Y, Lim SG, Tan TM (2014) miR-106b-25/miR-17-92 clusters: polycistrons with oncogenic roles in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 20:5962-5972
405. Tanzer A, Stadler PF (2004) Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol* 339:327-335
406. Tao J, Zhao X, Tao J (2014) c-MYC-miRNA circuitry: a central regulator of aggressive B-cell malignancies. *Cell Cycle* 13:191-198
407. Teague TK, Hildeman D, Kedl RM, Mitchell T, Rees W, Schaefer BC, Bender J, Kappler J, Marrack P (1999) Activation changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12691-12696
408. Teixeira FK, Okuniewska M, Malone CD, Coux RX, Rio DC, Lehmann R (2017) piRNA-mediated regulation of transposon alternative splicing in the soma and germ line. *Nature* 552:268-272
409. Tetzner R (2009) Prevention of PCR cross-contamination by UNG treatment of bisulfite-treated DNA. *Methods Mol Biol* 507:357-370

6. Literaturverzeichnis

410. Thaker YR, Schneider H, Rudd CE (2015) TCR and CD28 activate the transcription factor NF-kappaB in T-cells via distinct adaptor signaling complexes. *Immunol Lett* 163:113-119
411. The Gene Ontology C (2019) The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res* 47:D330-D338
412. Thompson JD, Gillespie D (1990) Current concepts in quantitative molecular hybridization. *Clin Biochem* 23:261-266
413. Thompson RC, Vardinogiannis I, Gilmore TD (2013) Identification of an NF-kappaB p50/p65-responsive site in the human MIR155HG promoter. *BMC Mol Biol* 14:24
414. Thomson T, Lin H (2009) The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:355-376
415. Tiainen P, Galaev I, Larsson PO (2007) Plasmid adsorption to anion-exchange matrices: comments on plasmid recovery. *Biotechnol J* 2:726-735
416. Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, Neuland CY, Pankiw-Trost LK, Blattner WA, Hoover RN (1989) The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy nonsmokers. *J Clin Immunol* 9:214-222
417. Toni LS, Garcia AM, Jeffrey DA, Jiang X, Stauffer BL, Miyamoto SD, Sucharov CC (2018) Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX* 5:599-608
418. Torri A, Carpi D, Bulgheroni E, Crosti MC, Moro M, Gruarin P, Rossi RL, Rossetti G, Di Vizio D, Hoxha M, Bollati V, Gagliani C, Tacchetti C, Paroni M, Geginat J, Corti L, Venegoni L, Berti E, Pagani M, Matarese G, Abrignani S, de Candia P (2017) Extracellular MicroRNA Signature of Human Helper T Cell Subsets in Health and Autoimmunity. *J Biol Chem* 292:2903-2915
419. Tosoni D, Puri C, Confalonieri S, Salcini AE, De Camilli P, Tacchetti C, Di Fiore PP (2005) TTP specifically regulates the internalization of the transferrin receptor. *Cell* 123:875-888
420. Trompeter HI, Abbad H, Iwaniuk KM, Hafner M, Renwick N, Tuschl T, Schira J, Muller HW, Wernet P (2011) MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b act in concert to modulate E2F activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of USSC. *PLoS One* 6:e16138
421. Tseng WC, Ho FL (2003) Enhanced purification of plasmid DNA using Q-Sepharose by modulation of alcohol concentrations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 791:263-272
422. Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, Crabtree GR (1990) Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol* 8:421-452
423. Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1663-1667
424. Vandeventer PE, Mejia J, Nadim A, Johal MS, Niemz A (2013) DNA adsorption to and elution from silica surfaces: influence of amino acid buffers. *J Phys Chem B* 117:10742-10749
425. Voytas D (2001) Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 2:Unit2 5A
426. Wang B, Li S, Qi HH, Chowdhury D, Shi Y, Novina CD (2009) Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins. *Nat Struct Mol Biol* 16:1259-1266

6. Literaturverzeichnis

427. Wang J, Chen J, Sen S (2016a) MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol* 231:25-30
428. Wang J, Rieder SA, Wu J, Hayes S, Halpin RA, de Los Reyes M, Shrestha Y, Kolbeck R, Raja R (2019) Evaluation of ultra-low input RNA sequencing for the study of human T cell transcriptome. *Sci Rep* 9:8445
429. Wang M, Windgassen D, Papoutsakis ET (2008) Comparative analysis of transcriptional profiling of CD3+, CD4+ and CD8+ T cells identifies novel immune response players in T-cell activation. *BMC Genomics* 9:225
430. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, McCormick LL, Fitzgerald P, Chi H, Munger J, Green DR (2011) The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* 35:871-882
431. Wang R, Deng X, Yuan C, Xin H, Liu G, Zhu Y, Jiang X, Wang C (2018) IFT80 Improves Invasion Ability in Gastric Cancer Cell Line via ift80/p75NGFR/MMP9 Signaling. *Int J Mol Sci* 19
432. Wang Y, Luo J, Zhang H, Lu J (2016b) microRNAs in the Same Clusters Evolve to Coordinately Regulate Functionally Related Genes. *Mol Biol Evol* 33:2232-2247
433. Wang Z, Chang C, Lu Q (2017) Epigenetics of CD4+ T cells in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol* 29:361-368
434. Ward JH (1963) Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association* 58:236-244
435. Warnefors M, Liechti A, Halbert J, Valloton D, Kaessmann H (2014) Conserved microRNA editing in mammalian evolution, development and disease. *Genome Biol* 15:R83
436. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, Chiba H, Kohara Y, Kono T, Nakano T, Surani MA, Sakaki Y, Sasaki H (2008) Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 453:539-543
437. Wells AC, Daniels KA, Angelou CC, Fagerberg E, Burnside AS, Markstein M, Alfandari D, Welsh RM, Pobezinskaya EL, Pobezinsky LA (2017) Modulation of let-7 miRNAs controls the differentiation of effector CD8 T cells. *Elife* 6
438. Wilk G, Braun R (2018) Integrative analysis reveals disrupted pathways regulated by microRNAs in cancer. *Nucleic Acids Res* 46:1089-1101
439. Willenbrock H, Salomon J, Sokilde R, Barken KB, Hansen TN, Nielsen FC, Moller S, Litman T (2009) Quantitative miRNA expression analysis: comparing microarrays with next-generation sequencing. *RNA* 15:2028-2034
440. Williams M, Cheng YY, Kirschner MB, Sarun KH, Schelch K, Winata P, McCaughan B, Kao S, Van Zandwijk N, Reid G (2019) Transcriptional suppression of the miR-15/16 family by c-Myc in malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget* 10:4125-4138
441. Wilson GG (1991) Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Res* 19:2539-2566
442. Winkle M, El-Daly SM, Fabbri M, Calin GA (2021) Noncoding RNA therapeutics - challenges and potential solutions. *Nat Rev Drug Discov*
443. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11:228-234

6. Literaturverzeichnis

444. Witkos TM, Koscianska E, Krzyzosiak WJ (2011) Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr Mol Med* 11:93-109
445. Wolf T, Jin W, Zoppi G, Vogel IA, Akhmedov M, Bleck CKE, Beltraminelli T, Rieckmann JC, Ramirez NJ, Benevento M, Notarbartolo S, Bumann D, Meissner F, Grimbacher B, Mann M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Kwee I, Geiger R (2020) Dynamics in protein translation sustaining T cell preparedness. *Nat Immunol* 21:927-937
446. Wright C, Rajpurohit A, Burke EE, Williams C, Collado-Torres L, Kimos M, Brandon NJ, Cross AJ, Jaffe AE, Weinberger DR, Shin JH (2019) Comprehensive assessment of multiple biases in small RNA sequencing reveals significant differences in the performance of widely used methods. *BMC Genomics* 20:513
447. Xing Z, Ma WK, Tran EJ (2019) The DDX5/Dbp2 subfamily of DEAD-box RNA helicases. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 10:e1519
448. Yang L, Boldin MP, Yu Y, Liu CS, Ea CK, Ramakrishnan P, Taganov KD, Zhao JL, Baltimore D (2012) miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *J Exp Med* 209:1655-1670
449. Yang N, Kazazian HH, Jr. (2006) L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nat Struct Mol Biol* 13:763-771
450. Yang W, Chendrimada TP, Wang Q, Higuchi M, Seeburg PH, Shiekhata R, Nishikura K (2006) Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol* 13:13-21
451. Yatim KM, Lakkis FG (2015) A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol* 10:1274-1281
452. Ye J, Xu M, Tian X, Cai S, Zeng S (2019) Research advances in the detection of miRNA. *J Pharm Anal* 9:217-226
453. Ye Z, Li G, Kim C, Hu B, Jadhav RR, Weyand CM, Goronzy JJ (2018) Regulation of miR-181a expression in T cell aging. *Nat Commun* 9:3060
454. Zhao E, Maj T, Kryczek I, Li W, Wu K, Zhao L, Wei S, Crespo J, Wan S, Vatan L, Szeliga W, Shao I, Wang Y, Liu Y, Varambally S, Chinnaiyan AM, Welling TH, Marquez V, Kotarski J, Wang H, Wang Z, Zhang Y, Liu R, Wang G, Zou W (2016) Cancer mediates effector T cell dysfunction by targeting microRNAs and EZH2 via glycolysis restriction. *Nat Immunol* 17:95-103
455. Zheng GX, Terry JM, Belgrader P, Ryvkin P, Bent ZW, Wilson R, Ziraldo SB, Wheeler TD, McDermott GP, Zhu J, Gregory MT, Shuga J, Montesclaros L, Underwood JG, Masquelier DA, Nishimura SY, Schnall-Levin M, Wyatt PW, Hindson CM, Bharadwaj R, Wong A, Ness KD, Beppu LW, Deeg HJ, McFarland C, Loeb KR, Valente WJ, Ericson NG, Stevens EA, Radich JP, Mikkelsen TS, Hindson BJ, Bielas JH (2017) Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun* 8:14049
456. Zheng YC, Chang J, Wang LC, Ren HM, Pang JR, Liu HM (2019) Lysine demethylase 5B (KDM5B): A potential anti-cancer drug target. *Eur J Med Chem* 161:131-140
457. Zhong X, Heinicke F, Rayner S (2019) miRBaseMiner, a tool for investigating miRBase content. *RNA Biol* 16:1534-1546
458. Zhou J, Zhu Z, Bai C, Sun H, Wang X (2014) Proteomic profiling of lymphocytes in autoimmunity, inflammation and cancer. *J Transl Med* 12:6

6. Literaturverzeichnis

459. Zhou R, Hu G, Gong AY, Chen XM (2010) Binding of NF-kappaB p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of miRNA genes in human biliary epithelial cells. *Nucleic Acids Res* 38:3222-3232
460. Zhu J, Paul WE (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112:1557-1569
461. Zhu J (2018) T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10
462. Ziemann M, Kaspi A, El-Osta A (2016) Evaluation of microRNA alignment techniques. *RNA* 22:1120-1138
463. Zou W (2005) Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5:263-274

7. Anhang

7.1. Tabellen im Anhang

Tabelle A 1: Übersicht der gemeinsamen, signifikant und deutlich veränderten miRNAs.

Die aufgelisteten miRNAs wurden im Zusammenhang mit den Zeitverlaufsanalysen der T-Zell-Aktivierung ermittelt und zeigten dabei sowohl deutliche (*Fold change* (FC) $\geq 1,5$) als auch signifikante Expressionsveränderungen in den Microarray-Analyseergebnissen beider Spender (Spender 1 / Spender 2). Die Zeitpunkte der minimalen und maximalen Expression, die FCs zwischen den zugehörigen Median-Expressionswerten und die entsprechenden p-Werte sind als Übersicht dargestellt. Wegen der multiplen Testung wurden die p-Werte zur Reduktion der Falscherkennungsrate adjustiert.

miRNA	Minimale Expression [h]	Maximale Expression [h]	FC zwischen maximaler und minimaler Expression (Median)	Adjustierter p-Wert
hsa-let-7b-5p	24 / 24	0 / 0	1,75 / 1,7	0,0491 / 0,0331
hsa-miR-15a-5p	24 / 24	0 / 0	1,71 / 2,04	0,0446 / 0,0372
hsa-miR-15b-5p	24 / 24	2 / 0	1,69 / 1,7	0,0495 / 0,0331
hsa-miR-17-3p	0 / 0	24 / 24	2,57 / 2,97	0,0446 / 0,0331
hsa-miR-17-5p	0 / 2	24 / 24	2,86 / 3,99	0,0469 / 0,0331
hsa-miR-18a-5p	2 / 2	24 / 24	4,72 / 5,59	0,0469 / 0,0331
hsa-miR-18b-5p	0 / 2	24 / 22	2,27 / 2,29	0,0446 / 0,0297
hsa-miR-19a-3p	0 / 2	24 / 24	1,78 / 2,23	0,0469 / 0,0371
hsa-miR-20a-3p	0 / 0	12 / 10	1,77 / 1,86	0,0367 / 0,0316
hsa-miR-20a-5p	0 / 2	24 / 22	2,02 / 2,44	0,0333 / 0,0313
hsa-miR-20b-5p	0 / 2	22 / 22	2 / 2,3	0,0333 / 0,0297
hsa-miR-21-3p	0 / 0	24 / 24	6,18 / 6,71	0,0286 / 0,0297
hsa-miR-21-5p	0 / 2	20 / 24	1,86 / 2,23	0,0367 / 0,0313
hsa-miR-23a-3p	24 / 24	4 / 0	1,51 / 1,65	0,0469 / 0,0429

7. Anhang

miRNA	Minimale Expression [h]	Maximale Expression [h]	FC zwischen maximaler und minimaler Expression (Median)	Adjustierter p-Wert
hsa-miR-26a-5p	20 / 24	0 / 2	1,62 / 1,81	0,0343 / 0,0336
hsa-miR-27a-3p	20 / 24	2 / 6	1,66 / 1,7	0,0446 / 0,0297
hsa-miR-29b-1-5p	0 / 0	12 / 14	4,34 / 4,4	0,0265 / 0,0297
hsa-miR-30c-5p	24 / 24	0 / 0	1,69 / 1,69	0,0495 / 0,0313
hsa-miR-30e-3p	20 / 24	0 / 0	1,5 / 1,7	0,0454 / 0,0297
hsa-miR-125b-5p	22 / 24	0 / 0	1,51 / 1,6	0,0469 / 0,0313
hsa-miR-132-3p	0 / 0	10 / 10	2,99 / 3,5	0,0265 / 0,0297
hsa-miR-132-5p	0 / 0	4 / 4	1,73 / 1,84	0,0286 / 0,0187
hsa-miR-155-3p	0 / 0	12 / 12	3,75 / 3,7	0,0152 / 0,0297
hsa-miR-155-5p	0 / 2	24 / 24	17,89 / 24,96	0,032 / 0,0297
hsa-miR-181a-5p	24 / 24	0 / 0	1,63 / 1,84	0,0469 / 0,0331
hsa-miR-221-3p	0 / 2	16 / 20	1,64 / 1,98	0,0489 / 0,0373
hsa-miR-223-3p	24 / 24	0 / 0	2,88 / 5,79	0,0333 / 0,0297
hsa-miR-630	0 / 0	24 / 18	2,13 / 2,79	0,0286 / 0,0297
hsa-miR-1260a	2 / 0	24 / 24	1,78 / 1,74	0,0343 / 0,0355
hsa-miR-1260b	6 / 0	24 / 24	1,75 / 1,91	0,0333 / 0,0313
hsa-miR-1273g-3p	4 / 0	24 / 24	1,65 / 1,53	0,0469 / 0,0331
hsa-miR-1275	22 / 24	0 / 0	1,55 / 1,51	0,0469 / 0,0313
hsa-miR-1290	0 / 0	22 / 24	2,25 / 2,2	0,0469 / 0,0313
hsa-miR-3196	0 / 0	24 / 24	1,53 / 1,56	0,0469 / 0,0446
hsa-miR-4286	2 / 0	24 / 22	1,5 / 1,56	0,0367 /

7. Anhang

miRNA	Minimale Expression [h]	Maximale Expression [h]	FC zwischen maximaler und minimaler Expression (Median)	Adjustierter p-Wert
				0,0331
hsa-miR-4521	0 / 0	22 / 20	1,64 / 1,6	0,0469 / 0,0313
hsa-miR-5703	0 / 0	24 / 18	1,92 / 2,32	0,0274 / 0,0313
hsa-miR-5787	2 / 0	24 / 20	1,68 / 1,8	0,0343 / 0,0297
hsa-miR-6085	4 / 8	24 / 22	1,57 / 1,72	0,0343 / 0,0328

Tabelle A 2: Übersicht zu den mittels dualen Hoch-Durchsatz-Luciferase-Assays getesteten potenziellen Zielgenen der miR-155-5p.

Nach einer *in silico* Zielgenvorhersage, wurden 19 Gene als mögliche miR-155-5p-Zielgene für die Testung mittels dualen Luciferase-Assays ausgewählt. Dabei wurde ein inverses Korrelationsverhältnis zwischen den zeitaufgelösten mRNA-Expressionsdaten und den Daten der miR-155-5p-Expression vorausgesetzt. (Pearson- und bzw. oder Spearman-Korrelationskoeffizient: $\leq -0,8$, bei mindestens einem der Spender). Die Korrelationskoeffizienten wurden auf Basis der Median-Expressionswerte bestimmt. Die getesteten Gene wiesen ein unterschiedliches Maß an Expressionsreduktion während des Zeitverlaufs auf. Die maximale Reduktion der mRNA während des Zeitverlaufs wurde als *Fold Decrease* auf Grundlage der Median-Expressionswerte des jeweiligen Spenders und im Vergleich zum 0 h Zeitpunkt berechnet.

Mögliches Zielgen (Gensymbol)	Spender 1			Spender 2		
	Pearson-Korrelation	Spearman-Korrelation	Maximale Reduktion der mRNA (<i>Fold Decrease</i>)	Pearson-Korrelation	Spearman-Korrelation	Maximale Reduktion der mRNA (<i>Fold Decrease</i>)
<i>ADD3</i>	-0,98	-0,98	7,57	-0,97	-0,98	10,58
<i>CYP2U1</i>	-0,89	-0,94	2,79	-0,79	-0,59	2,91
<i>DDX17</i>	-0,98	-0,95	2,33	-0,99	-0,98	2,3
<i>EZH1</i>	-0,96	-0,98	3,12	-0,97	-0,9	2,86
<i>HERC3</i>	-0,93	-0,97	2,01	-0,88	-0,66	2,04
<i>IFT80</i>	-0,76	-0,87	2,9	-0,77	-0,84	2,72

7. Anhang

<i>JMY</i>	-0,91	-0,97	2,55	-0,97	-0,91	3,27
<i>KDM5B</i>	-0,6	-0,85	1,35	-0,62	-0,81	1,48
<i>LAT2</i>	-0,96	-0,97	2,47	-0,97	-0,96	3,21
<i>LDLRAP1</i>	-0,89	-0,48	24,06	-0,83	-0,49	26,3
<i>RASA3</i>	-0,95	-0,69	14,43	-0,95	-0,78	12,85
<i>RXRA</i>	-0,97	-0,76	5,63	-0,99	-0,9	9,46
<i>S100B</i>	-0,95	-0,91	1,81	-0,96	-0,85	1,71
<i>SH3BP4</i>	-0,91	-0,95	1,24	-0,81	-0,63	1,49
<i>SORL1</i>	-0,95	-0,78	23,36	-0,98	-0,84	18,2
<i>STARD8</i>	-0,39	-0,65	1,17	-0,65	-0,82	1,5
<i>TADA2B</i>	-0,83	-0,94	1,87	-0,88	-0,96	1,75
<i>TAF7</i>	-0,99	-0,95	1,83	-0,9	-0,79	1,95
<i>ZFP36</i>	-0,97	-0,97	4,46	-0,98	-0,95	6,75

Tabelle A 3: Ergebnisübersicht der Hoch-Durchsatz Luciferase-Reportergen-Assays zur Identifizierung von Zielgenen der miR-155-5p.

Die normierten Messergebnisse der 3'UTR-Konstrukte wurden in Relation zur Aktivität des leeren Reporterplasmids (pMIR-RNL-TK \equiv 100 %) gesetzt. Die relative Luciferase-Aktivität [%] ist als Mittelwert und mit Angabe des Standardfehlers (SEM) aus vier (initiale Analysen (**A**)) bzw. drei (Validierung (**B**)) unabhängigen Untersuchungen mit technischen Duplikaten dargestellt. Die FDR adjustierten p-Werte sind im Vergleich zur leeren Reporter-Kontrolle angegeben.

A)

3'UTR-Konstrukt	Mittelwert [%] \pm SEM	p-Wert (Adjustiert)
pMIR-ADD3	45,2 \pm 1,7	1,04 \times 10 ⁻¹²
pMIR-CYP2U1	64,8 \pm 4,4	2,98 \times 10 ⁻⁶
pMIR-DDX17	75,1 \pm 2,4	2,16 \times 10 ⁻⁷
pMIR-EZH1	81,2 \pm 2,6	8,77 \times 10 ⁻⁶
pMIR-HERC3	87,2 \pm 2,4	1,84 \times 10 ⁻⁴
pMIR-IFT80	64 \pm 4,9	5,98 \times 10 ⁻⁶
pMIR-JMY	68,5 \pm 5,0	2,91 \times 10 ⁻⁵
pMIR-KDM5B_1	55,1 \pm 2,4	2,97 \times 10 ⁻¹⁰
pMIR-KDM5B_2	59,1 \pm 2,5	8,52 \times 10 ⁻¹⁰
pMIR-LAT2	75,6 \pm 2,5	5,08 \times 10 ⁻⁷
pMIR-LDLRAP1	72,5 \pm 2,8	3,70 \times 10 ⁻⁷
pMIR-RASA3	99,7 \pm 4,2	0,94
pMIR-RXRA	94,3 \pm 3,8	0,17
pMIR-S100B	82 \pm 3,6	2,36 \times 10 ⁻⁴
pMIR-SH3BP4	79,5 \pm 2,6	3,79 \times 10 ⁻⁶
pMIR-SORL1	83,1 \pm 2,6	2,98 \times 10 ⁻⁵
pMIR-STARD8	58,8 \pm 3,5	4,21 \times 10 ⁻⁸
pMIR-TADA2B	61,7 \pm 1,9	1,39 \times 10 ⁻¹⁰

7. Anhang

pMIR-TAF7	72,5 ± 5,7	3,15×10 ⁻⁴
pMIR-ZFP36	70,1 ± 2,3	1,96×10 ⁻⁸

B)

3'UTR-Konstrukt	Mittelwert [%] ± SEM	p-Wert (Adjustiert)
pMIR-ADD3	46,4 ± 2,1	6,61×10 ⁻⁷
pMIR-ADD3mut	103,0 ± 3,7	0,55
pMIR-LAT2	65,5 ± 6,0	8,40×10 ⁻⁴
pMIR-LAT2mut	106,8 ± 4	0,27
pMIR-S100B	72,8 ± 2,8	2,24×10 ⁻⁴
pMIR-S100Bmut	92,0 ± 5,0	0,27
pMIR-STARDB8	70,6 ± 3,5	2,24×10 ⁻⁴
pMIR-STARDB8mut	92,4 ± 8,9	0,50

Tabelle A 4: Übersicht prominenter miRNAs mit vergleichsweise hoher molekularer Expressionsmenge und bzw. oder starker Expressionsveränderung im Zusammenhang mit der T-Zell-Aktivierung.

Die aufgelisteten miRNAs wiesen anhand der molekularen Quantifizierung eine vergleichsweise hohe Expressionsmenge (Expressionsmaximum >10⁶ Moleküle/75 ng) und bzw. oder starke Expressionsveränderungen (Δ Max=Maximale Expressionsänderung; >10⁶ Moleküle/75 ng) im Zusammenhang mit der T-Zell-Aktivierung auf. (Die jeweilige maximale Expressionsmenge ist in der Tabelle dunkelgrau hinterlegt, die minimale Expressionsmenge ist hellgrau hinterlegt; Die Darstellung erfolgte anhand von gerundeten molekularen Expressionswerten; [Moleküle/75 ng])

miRNA	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h	22 h	24 h	Δ Max
hsa-miR-7975	1,569×10 ¹⁰	1,586×10 ¹⁰	1,772×10 ¹⁰	1,749×10 ¹⁰	1,828×10 ¹⁰	1,890×10 ¹⁰	1,784×10 ¹⁰	1,683×10 ¹⁰	1,741×10 ¹⁰	1,733×10 ¹⁰	1,854×10 ¹⁰	2,098×10 ¹⁰	2,062×10 ¹⁰	5,294×10 ⁹
hsa-miR-7977	4,233×10 ⁹	4,040×10 ⁹	4,730×10 ⁹	5,050×10 ⁹	5,729×10 ⁹	5,793×10 ⁹	5,873×10 ⁹	6,168×10 ⁹	6,033×10 ⁹	6,273×10 ⁹	7,266×10 ⁹	7,810×10 ⁹	8,317×10 ⁹	4,278×10 ⁹
hsa-miR-142-3p	1,209×10 ⁹	1,205×10 ⁹	1,113×10 ⁹	1,138×10 ⁹	1,032×10 ⁹	1,002×10 ⁹	1,027×10 ⁹	8,116×10 ⁸	7,189×10 ⁸	6,644×10 ⁸	6,630×10 ⁸	5,938×10 ⁸	6,474×10 ⁸	6,152×10 ⁸
hsa-miR-150-5p	1,146×10 ⁹	1,162×10 ⁹	1,095×10 ⁹	1,095×10 ⁹	1,034×10 ⁹	9,251×10 ⁸	8,688×10 ⁸	7,123×10 ⁸	6,184×10 ⁸	6,279×10 ⁸	5,976×10 ⁸	5,339×10 ⁸	5,256×10 ⁸	6,359×10 ⁸
hsa-miR-8069	3,244×10 ⁸	3,233×10 ⁸	3,156×10 ⁸	3,088×10 ⁸	3,069×10 ⁸	2,826×10 ⁸	2,682×10 ⁸	2,410×10 ⁸	2,219×10 ⁸	2,219×10 ⁸	1,952×10 ⁸	1,734×10 ⁸	1,711×10 ⁸	1,532×10 ⁸
hsa-miR-5100	2,177×10 ⁸	2,128×10 ⁸	2,255×10 ⁸	2,324×10 ⁸	2,475×10 ⁸	2,482×10 ⁸	2,521×10 ⁸	2,506×10 ⁸	2,501×10 ⁸	2,553×10 ⁸	2,883×10 ⁸	2,949×10 ⁸	3,180×10 ⁸	1,052×10 ⁸

7. Anhang

miRNA	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h	22 h	24 h	ΔMax
hsa-let-7g-5p	2,347× 10 ⁸	2,532× 10 ⁸	2,354× 10 ⁸	2,387× 10 ⁸	2,265× 10 ⁸	1,995× 10 ⁸	1,986× 10 ⁸	1,539× 10 ⁸	1,460× 10 ⁸	1,544× 10 ⁸	1,440× 10 ⁸	1,345× 10 ⁸	1,337× 10 ⁸	1,195× 10 ⁸
hsa-miR-21-5p	8,758× 10 ⁷	8,683× 10 ⁷	9,408× 10 ⁷	1,221× 10 ⁸	1,285× 10 ⁸	1,360× 10 ⁸	1,404× 10 ⁸	1,355× 10 ⁸	1,357× 10 ⁸	1,270× 10 ⁸	1,379× 10 ⁸	1,450× 10 ⁸	1,654× 10 ⁸	7,860× 10 ⁷
hsa-miR-29a-3p	1,358× 10 ⁸	1,304× 10 ⁸	1,478× 10 ⁸	1,443× 10 ⁸	1,616× 10 ⁸	1,490× 10 ⁸	1,580× 10 ⁸	1,394× 10 ⁸	1,371× 10 ⁸	1,452× 10 ⁸	1,503× 10 ⁸	1,397× 10 ⁸	1,543× 10 ⁸	3,115× 10 ⁷
hsa-miR-29c-3p	1,128× 10 ⁸	1,225× 10 ⁸	1,126× 10 ⁸	1,176× 10 ⁸	1,153× 10 ⁸	1,006× 10 ⁸	1,032× 10 ⁸	9,099× 10 ⁷	8,510× 10 ⁷	8,505× 10 ⁷	8,071× 10 ⁷	7,279× 10 ⁷	7,387× 10 ⁷	4,974× 10 ⁷
hsa-miR-16-5p	1,075× 10 ⁸	1,084× 10 ⁸	9,602× 10 ⁷	9,955× 10 ⁷	9,310× 10 ⁷	8,631× 10 ⁷	8,434× 10 ⁷	6,687× 10 ⁷	6,704× 10 ⁷	6,667× 10 ⁷	6,048× 10 ⁷	5,561× 10 ⁷	5,412× 10 ⁷	5,430× 10 ⁷
hsa-miR-1260a	6,968× 10 ⁷	6,787× 10 ⁷	6,855× 10 ⁷	6,929× 10 ⁷	7,377× 10 ⁷	7,560× 10 ⁷	7,495× 10 ⁷	7,488× 10 ⁷	7,179× 10 ⁷	7,462× 10 ⁷	8,403× 10 ⁷	8,816× 10 ⁷	1,073× 10 ⁸	3,942× 10 ⁷
hsa-miR-29b-3p	7,181× 10 ⁷	8,171× 10 ⁷	7,668× 10 ⁷	8,647× 10 ⁷	8,976× 10 ⁷	8,446× 10 ⁷	9,501× 10 ⁷	8,739× 10 ⁷	9,274× 10 ⁷	9,367× 10 ⁷	1,004× 10 ⁸	8,878× 10 ⁷	1,055× 10 ⁸	3,369× 10 ⁷
hsa-miR-155-5p	4,779× 10 ⁶	4,985× 10 ⁶	1,102× 10 ⁷	2,341× 10 ⁷	3,769× 10 ⁷	4,866× 10 ⁷	5,779× 10 ⁷	6,999× 10 ⁷	6,958× 10 ⁷	8,003× 10 ⁷	9,440× 10 ⁷	1,028× 10 ⁸	1,024× 10 ⁸	9,800× 10 ⁷
hsa-let-7f-5p	9,573× 10 ⁷	9,813× 10 ⁷	9,274× 10 ⁷	9,748× 10 ⁷	9,299× 10 ⁷	8,829× 10 ⁷	8,967× 10 ⁷	6,762× 10 ⁷	6,972× 10 ⁷	7,062× 10 ⁷	6,982× 10 ⁷	6,088× 10 ⁷	6,668× 10 ⁷	3,724× 10 ⁷
hsa-let-7a-5p	8,878× 10 ⁷	9,247× 10 ⁷	8,777× 10 ⁷	8,831× 10 ⁷	8,456× 10 ⁷	7,749× 10 ⁷	8,065× 10 ⁷	6,083× 10 ⁷	6,015× 10 ⁷	6,255× 10 ⁷	6,152× 10 ⁷	5,388× 10 ⁷	5,473× 10 ⁷	3,860× 10 ⁷
hsa-miR-19b-3p	5,765× 10 ⁷	5,369× 10 ⁷	6,275× 10 ⁷	7,403× 10 ⁷	7,913× 10 ⁷	8,050× 10 ⁷	9,165× 10 ⁷	8,259× 10 ⁷	8,195× 10 ⁷	8,457× 10 ⁷	8,362× 10 ⁷	7,618× 10 ⁷	8,857× 10 ⁷	3,796× 10 ⁷
hsa-miR-342-3p	9,050× 10 ⁷	7,957× 10 ⁷	8,598× 10 ⁷	8,151× 10 ⁷	8,176× 10 ⁷	7,380× 10 ⁷	7,489× 10 ⁷	6,248× 10 ⁷	5,782× 10 ⁷	5,597× 10 ⁷	5,509× 10 ⁷	4,899× 10 ⁷	4,610× 10 ⁷	4,440× 10 ⁷
hsa-miR-26a-5p	8,831× 10 ⁷	9,009× 10 ⁷	8,467× 10 ⁷	8,318× 10 ⁷	8,365× 10 ⁷	7,310× 10 ⁷	6,960× 10 ⁷	5,694× 10 ⁷	5,489× 10 ⁷	5,148× 10 ⁷	4,755× 10 ⁷	4,336× 10 ⁷	4,437× 10 ⁷	4,674× 10 ⁷
hsa-miR-142-5p	7,857× 10 ⁷	8,875× 10 ⁷	8,017× 10 ⁷	8,495× 10 ⁷	8,012× 10 ⁷	6,661× 10 ⁷	6,889× 10 ⁷	6,204× 10 ⁷	5,891× 10 ⁷	5,594× 10 ⁷	5,145× 10 ⁷	4,900× 10 ⁷	5,090× 10 ⁷	3,976× 10 ⁷
hsa-miR-4286	5,791× 10 ⁷	5,765× 10 ⁷	6,239× 10 ⁷	6,520× 10 ⁷	6,716× 10 ⁷	6,878× 10 ⁷	6,940× 10 ⁷	6,740× 10 ⁷	6,198× 10 ⁷	6,657× 10 ⁷	7,211× 10 ⁷	7,151× 10 ⁷	8,233× 10 ⁷	2,467× 10 ⁷
hsa-miR-20a-5p	3,935× 10 ⁷	4,105× 10 ⁷	4,389× 10 ⁷	5,552× 10 ⁷	6,380× 10 ⁷	6,803× 10 ⁷	7,646× 10 ⁷	7,303× 10 ⁷	7,131× 10 ⁷	7,545× 10 ⁷	7,870× 10 ⁷	7,831× 10 ⁷	7,918× 10 ⁷	3,983× 10 ⁷
hsa-miR-26b-5p	7,287× 10 ⁷	7,402× 10 ⁷	7,099× 10 ⁷	7,205× 10 ⁷	6,856× 10 ⁷	6,318× 10 ⁷	6,459× 10 ⁷	4,917× 10 ⁷	4,991× 10 ⁷	4,859× 10 ⁷	4,524× 10 ⁷	4,133× 10 ⁷	4,399× 10 ⁷	3,269× 10 ⁷
hsa-miR-4284	4,659× 10 ⁷	4,142× 10 ⁷	4,381× 10 ⁷	4,295× 10 ⁷	4,739× 10 ⁷	4,325× 10 ⁷	4,138× 10 ⁷	4,151× 10 ⁷	4,066× 10 ⁷	4,112× 10 ⁷	4,638× 10 ⁷	4,875× 10 ⁷	5,492× 10 ⁷	1,426× 10 ⁷
hsa-miR-1273g-3p	3,789× 10 ⁷	3,715× 10 ⁷	3,778× 10 ⁷	4,075× 10 ⁷	4,208× 10 ⁷	4,101× 10 ⁷	4,495× 10 ⁷	4,175× 10 ⁷	4,498× 10 ⁷	4,485× 10 ⁷	4,418× 10 ⁷	4,507× 10 ⁷	5,198× 10 ⁷	1,483× 10 ⁷
hsa-miR-223-3p	3,967× 10 ⁷	2,645× 10 ⁷	2,773× 10 ⁷	2,627× 10 ⁷	2,608× 10 ⁷	2,236× 10 ⁷	2,017× 10 ⁷	1,602× 10 ⁷	1,472× 10 ⁷	1,204× 10 ⁷	1,043× 10 ⁷	8,642× 10 ⁶	6,932× 10 ⁶	3,273× 10 ⁷
hsa-miR-1260b	2,574× 10 ⁷	2,427× 10 ⁷	2,488× 10 ⁷	2,472× 10 ⁷	2,723× 10 ⁷	2,712× 10 ⁷	2,738× 10 ⁷	2,725× 10 ⁷	2,688× 10 ⁷	2,694× 10 ⁷	3,122× 10 ⁷	3,390× 10 ⁷	3,692× 10 ⁷	1,265× 10 ⁷
hsa-miR-146b-5p	3,562× 10 ⁷	3,610× 10 ⁷	3,570× 10 ⁷	3,475× 10 ⁷	3,412× 10 ⁷	3,074× 10 ⁷	2,925× 10 ⁷	2,479× 10 ⁷	2,355× 10 ⁷	2,190× 10 ⁷	2,294× 10 ⁷	2,096× 10 ⁷	2,040× 10 ⁷	1,570× 10 ⁷
hsa-let-7i-5p	3,359× 10 ⁷	3,519× 10 ⁷	3,323× 10 ⁷	3,416× 10 ⁷	3,235× 10 ⁷	3,006× 10 ⁷	3,056× 10 ⁷	2,450× 10 ⁷	2,320× 10 ⁷	2,410× 10 ⁷	2,451× 10 ⁷	2,273× 10 ⁷	2,164× 10 ⁷	1,355× 10 ⁷
hsa-miR-17-5p	1,181× 10 ⁷	1,173× 10 ⁷	1,396× 10 ⁷	1,960× 10 ⁷	2,538× 10 ⁷	2,785× 10 ⁷	3,132× 10 ⁷	3,263× 10 ⁷	3,040× 10 ⁷	3,137× 10 ⁷	3,359× 10 ⁷	3,468× 10 ⁷	3,485× 10 ⁷	2,312× 10 ⁷
hsa-miR-30b-5p	3,042× 10 ⁷	3,171× 10 ⁷	2,969× 10 ⁷	3,036× 10 ⁷	2,905× 10 ⁷	2,588× 10 ⁷	2,584× 10 ⁷	2,212× 10 ⁷	2,028× 10 ⁷	1,948× 10 ⁷	1,914× 10 ⁷	1,735× 10 ⁷	1,811× 10 ⁷	1,435× 10 ⁷
hsa-miR-15b-5p	2,957× 10 ⁷	2,862× 10 ⁷	2,631× 10 ⁷	2,792× 10 ⁷	2,678× 10 ⁷	2,410× 10 ⁷	2,511× 10 ⁷	1,981× 10 ⁷	1,888× 10 ⁷	1,935× 10 ⁷	1,711× 10 ⁷	1,633× 10 ⁷	1,561× 10 ⁷	1,396× 10 ⁷
hsa-miR-19a-3p	1,513× 10 ⁷	1,595× 10 ⁷	1,644× 10 ⁷	2,019× 10 ⁷	2,133× 10 ⁷	2,182× 10 ⁷	2,443× 10 ⁷	2,297× 10 ⁷	2,232× 10 ⁷	2,355× 10 ⁷	2,453× 10 ⁷	2,310× 10 ⁷	2,507× 10 ⁷	9,943× 10 ⁶
hsa-miR-20b-5p	1,284× 10 ⁷	1,336× 10 ⁷	1,433× 10 ⁷	1,806× 10 ⁷	1,977× 10 ⁷	2,140× 10 ⁷	2,395× 10 ⁷	2,203× 10 ⁷	2,237× 10 ⁷	2,294× 10 ⁷	2,319× 10 ⁷	2,361× 10 ⁷	2,435× 10 ⁷	1,151× 10 ⁷
hsa-let-7b-5p	2,153× 10 ⁷	2,110× 10 ⁷	1,994× 10 ⁷	1,934× 10 ⁷	1,921× 10 ⁷	1,713× 10 ⁷	1,723× 10 ⁷	1,422× 10 ⁷	1,385× 10 ⁷	1,367× 10 ⁷	1,329× 10 ⁷	1,243× 10 ⁷	1,102× 10 ⁷	1,051× 10 ⁷
hsa-miR-92a-3p	1,172× 10 ⁷	1,117× 10 ⁷	1,349× 10 ⁷	1,577× 10 ⁷	1,846× 10 ⁷	1,946× 10 ⁷	2,079× 10 ⁷	2,044× 10 ⁷	1,996× 10 ⁷	2,003× 10 ⁷	2,139× 10 ⁷	2,025× 10 ⁷	2,127× 10 ⁷	1,023× 10 ⁷
hsa-miR-101-3p	1,787× 10 ⁷	1,937× 10 ⁷	1,780× 10 ⁷	1,887× 10 ⁷	1,862× 10 ⁷	1,634× 10 ⁷	1,688× 10 ⁷	1,413× 10 ⁷	1,378× 10 ⁷	1,299× 10 ⁷	1,258× 10 ⁷	1,111× 10 ⁷	1,276× 10 ⁷	8,255× 10 ⁶
hsa-miR-23a-3p	1,878× 10 ⁷	1,798× 10 ⁷	1,796× 10 ⁷	1,924× 10 ⁷	1,929× 10 ⁷	1,769× 10 ⁷	1,788× 10 ⁷	1,470× 10 ⁷	1,331× 10 ⁷	1,240× 10 ⁷	1,115× 10 ⁷	9,979× 10 ⁶	1,030× 10 ⁷	9,310× 10 ⁶
hsa-miR-103a-3p	1,710× 10 ⁷	1,474× 10 ⁷	1,459× 10 ⁷	1,451× 10 ⁷	1,467× 10 ⁷	1,362× 10 ⁷	1,400× 10 ⁷	1,148× 10 ⁷	1,110× 10 ⁷	1,088× 10 ⁷	1,058× 10 ⁷	9,696× 10 ⁶	1,001× 10 ⁷	7,406× 10 ⁶
hsa-miR-15a-5p	1,705× 10 ⁷	1,576× 10 ⁷	1,433× 10 ⁷	1,541× 10 ⁷	1,463× 10 ⁷	1,314× 10 ⁷	1,407× 10 ⁷	1,045× 10 ⁷	1,042× 10 ⁷	1,006× 10 ⁷	9,496× 10 ⁶	7,862× 10 ⁶	8,132× 10 ⁶	9,186× 10 ⁶

7. Anhang

miRNA	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h	22 h	24 h	ΔMax
hsa-miR-7641	1,397× 10 ⁷	1,189× 10 ⁷	1,314× 10 ⁷	1,266× 10 ⁷	1,427× 10 ⁷	1,412× 10 ⁷	1,331× 10 ⁷	1,209× 10 ⁷	1,315× 10 ⁷	1,358× 10 ⁷	1,311× 10 ⁷	1,416× 10 ⁷	1,520× 10 ⁷	3,310× 10 ⁶
hsa-miR-27a-3p	1,303× 10 ⁷	1,507× 10 ⁷	1,428× 10 ⁷	1,514× 10 ⁷	1,425× 10 ⁷	1,311× 10 ⁷	1,217× 10 ⁷	1,027× 10 ⁷	9,430× 10 ⁶	8,912× 10 ⁶	8,002× 10 ⁶	7,531× 10 ⁶	7,886× 10 ⁶	7,613× 10 ⁶
hsa-miR-6085	1,176× 10 ⁷	1,073× 10 ⁷	1,091× 10 ⁷	1,162× 10 ⁷	1,169× 10 ⁷	1,194× 10 ⁷	1,184× 10 ⁷	1,199× 10 ⁷	1,225× 10 ⁷	1,201× 10 ⁷	1,301× 10 ⁷	1,354× 10 ⁷	1,455× 10 ⁷	3,819× 10 ⁶
hsa-miR-107	1,409× 10 ⁷	1,341× 10 ⁷	1,264× 10 ⁷	1,319× 10 ⁷	1,262× 10 ⁷	1,178× 10 ⁷	1,213× 10 ⁷	9,892× 10 ⁶	9,691× 10 ⁶	9,849× 10 ⁶	9,499× 10 ⁶	8,420× 10 ⁶	9,312× 10 ⁶	5,674× 10 ⁶
hsa-miR-30e-5p	1,332× 10 ⁷	1,347× 10 ⁷	1,291× 10 ⁷	1,244× 10 ⁷	1,243× 10 ⁷	1,105× 10 ⁷	1,071× 10 ⁷	9,305× 10 ⁶	8,471× 10 ⁶	8,276× 10 ⁶	7,593× 10 ⁶	7,038× 10 ⁶	7,299× 10 ⁶	6,428× 10 ⁶
hsa-miR-25-3p	1,301× 10 ⁷	1,308× 10 ⁷	1,260× 10 ⁷	1,265× 10 ⁷	1,217× 10 ⁷	1,108× 10 ⁷	1,129× 10 ⁷	8,477× 10 ⁶	9,172× 10 ⁶	8,951× 10 ⁶	8,539× 10 ⁶	7,543× 10 ⁶	8,282× 10 ⁶	5,540× 10 ⁶
hsa-miR-106b-5p	1,277× 10 ⁷	1,266× 10 ⁷	1,175× 10 ⁷	1,206× 10 ⁷	1,136× 10 ⁷	1,058× 10 ⁷	1,073× 10 ⁷	8,738× 10 ⁶	8,379× 10 ⁶	8,570× 10 ⁶	8,140× 10 ⁶	7,511× 10 ⁶	8,418× 10 ⁶	5,257× 10 ⁶
hsa-miR-146a-5p	1,182× 10 ⁷	1,190× 10 ⁷	1,154× 10 ⁷	1,204× 10 ⁷	1,213× 10 ⁷	1,111× 10 ⁷	1,002× 10 ⁷	9,054× 10 ⁶	8,571× 10 ⁶	7,911× 10 ⁶	7,755× 10 ⁶	7,039× 10 ⁶	6,903× 10 ⁶	5,224× 10 ⁶
hsa-let-7d-5p	1,163× 10 ⁷	1,209× 10 ⁷	1,173× 10 ⁷	1,162× 10 ⁷	1,151× 10 ⁷	1,068× 10 ⁷	1,082× 10 ⁷	8,836× 10 ⁶	8,616× 10 ⁶	8,616× 10 ⁶	8,620× 10 ⁶	7,781× 10 ⁶	7,897× 10 ⁶	4,307× 10 ⁶
hsa-miR-451a	7,866× 10 ⁶	7,318× 10 ⁶	1,126× 10 ⁷	1,128× 10 ⁷	1,164× 10 ⁷	9,658× 10 ⁶	8,394× 10 ⁶	8,238× 10 ⁶	7,171× 10 ⁶	6,665× 10 ⁶	5,197× 10 ⁶	4,531× 10 ⁶	4,361× 10 ⁶	7,275× 10 ⁶
hsa-miR-140-3p	1,101× 10 ⁷	1,097× 10 ⁷	1,039× 10 ⁷	1,014× 10 ⁷	1,012× 10 ⁷	8,983× 10 ⁶	9,196× 10 ⁶	7,594× 10 ⁶	7,296× 10 ⁶	7,155× 10 ⁶	7,113× 10 ⁶	6,183× 10 ⁶	6,592× 10 ⁶	4,830× 10 ⁶
hsa-miR-24-3p	1,074× 10 ⁷	1,071× 10 ⁷	1,010× 10 ⁷	1,067× 10 ⁷	1,055× 10 ⁷	9,782× 10 ⁶	9,811× 10 ⁶	8,142× 10 ⁶	8,074× 10 ⁶	7,953× 10 ⁶	7,797× 10 ⁶	7,075× 10 ⁶	7,396× 10 ⁶	3,661× 10 ⁶
hsa-miR-6826-5p	6,405× 10 ⁶	5,939× 10 ⁶	6,662× 10 ⁶	7,358× 10 ⁶	7,999× 10 ⁶	7,927× 10 ⁶	8,496× 10 ⁶	8,760× 10 ⁶	8,172× 10 ⁶	8,468× 10 ⁶	9,445× 10 ⁶	1,042× 10 ⁷	1,061× 10 ⁷	4,669× 10 ⁶
hsa-miR-181a-5p	1,036× 10 ⁷	9,983× 10 ⁶	1,012× 10 ⁷	9,915× 10 ⁶	1,032× 10 ⁷	9,457× 10 ⁶	8,504× 10 ⁶	7,871× 10 ⁶	6,903× 10 ⁶	6,330× 10 ⁶	5,521× 10 ⁶	5,334× 10 ⁶	5,319× 10 ⁶	5,045× 10 ⁶
hsa-miR-5739	7,782× 10 ⁶	7,089× 10 ⁶	7,388× 10 ⁶	7,660× 10 ⁶	7,942× 10 ⁶	7,901× 10 ⁶	7,991× 10 ⁶	7,990× 10 ⁶	8,144× 10 ⁶	7,821× 10 ⁶	8,612× 10 ⁶	8,960× 10 ⁶	9,416× 10 ⁶	2,327× 10 ⁶
hsa-miR-3653-3p	7,566× 10 ⁶	7,393× 10 ⁶	7,205× 10 ⁶	7,707× 10 ⁶	7,128× 10 ⁶	6,686× 10 ⁶	6,668× 10 ⁶	6,070× 10 ⁶	5,457× 10 ⁶	5,215× 10 ⁶	5,001× 10 ⁶	4,798× 10 ⁶	4,595× 10 ⁶	3,113× 10 ⁶
hsa-miR-374a-5p	7,243× 10 ⁶	7,699× 10 ⁶	6,928× 10 ⁶	7,212× 10 ⁶	6,975× 10 ⁶	6,141× 10 ⁶	6,117× 10 ⁶	5,417× 10 ⁶	5,013× 10 ⁶	4,962× 10 ⁶	4,920× 10 ⁶	4,700× 10 ⁶	4,748× 10 ⁶	2,999× 10 ⁶
hsa-miR-363-3p	6,513× 10 ⁶	6,621× 10 ⁶	6,414× 10 ⁶	6,861× 10 ⁶	6,648× 10 ⁶	6,302× 10 ⁶	6,701× 10 ⁶	5,611× 10 ⁶	5,453× 10 ⁶	5,392× 10 ⁶	5,373× 10 ⁶	5,096× 10 ⁶	5,157× 10 ⁶	1,766× 10 ⁶
hsa-miR-30c-5p	6,737× 10 ⁶	6,774× 10 ⁶	6,280× 10 ⁶	6,540× 10 ⁶	6,059× 10 ⁶	5,527× 10 ⁶	5,596× 10 ⁶	4,512× 10 ⁶	4,346× 10 ⁶	4,072× 10 ⁶	3,775× 10 ⁶	3,426× 10 ⁶	3,529× 10 ⁶	3,348× 10 ⁶
hsa-let-7c-5p	6,773× 10 ⁶	6,624× 10 ⁶	6,263× 10 ⁶	6,405× 10 ⁶	6,084× 10 ⁶	5,581× 10 ⁶	5,535× 10 ⁶	4,179× 10 ⁶	4,644× 10 ⁶	4,567× 10 ⁶	4,568× 10 ⁶	3,640× 10 ⁶	3,848× 10 ⁶	3,133× 10 ⁶
hsa-miR-342-5p	6,428× 10 ⁶	6,264× 10 ⁶	6,425× 10 ⁶	6,203× 10 ⁶	5,930× 10 ⁶	5,623× 10 ⁶	5,629× 10 ⁶	4,409× 10 ⁶	4,751× 10 ⁶	4,474× 10 ⁶	4,418× 10 ⁶	3,801× 10 ⁶	3,778× 10 ⁶	2,650× 10 ⁶
hsa-miR-6127	5,825× 10 ⁶	5,680× 10 ⁶	5,682× 10 ⁶	6,363× 10 ⁶	6,033× 10 ⁶	6,134× 10 ⁶	6,362× 10 ⁶	5,222× 10 ⁶	5,244× 10 ⁶	5,308× 10 ⁶	5,106× 10 ⁶	5,049× 10 ⁶	5,269× 10 ⁶	1,315× 10 ⁶
hsa-miR-664b-3p	6,329× 10 ⁶	6,245× 10 ⁶	6,164× 10 ⁶	6,223× 10 ⁶	6,309× 10 ⁶	5,965× 10 ⁶	5,855× 10 ⁶	5,313× 10 ⁶	4,993× 10 ⁶	4,824× 10 ⁶	4,608× 10 ⁶	4,353× 10 ⁶	4,453× 10 ⁶	1,976× 10 ⁶
hsa-miR-6089	5,264× 10 ⁶	5,427× 10 ⁶	5,987× 10 ⁶	5,893× 10 ⁶	5,982× 10 ⁶	5,416× 10 ⁶	5,156× 10 ⁶	4,922× 10 ⁶	5,213× 10 ⁶	5,407× 10 ⁶	4,912× 10 ⁶	4,544× 10 ⁶	4,744× 10 ⁶	1,443× 10 ⁶
hsa-miR-21-3p	8,900× 10 ⁵	3,859× 10 ⁶	3,852× 10 ⁶	4,259× 10 ⁶	4,713× 10 ⁶	4,557× 10 ⁶	4,493× 10 ⁶	4,836× 10 ⁶	4,933× 10 ⁶	4,783× 10 ⁶	5,285× 10 ⁶	5,157× 10 ⁶	5,796× 10 ⁶	4,906× 10 ⁶
hsa-miR-494-3p	4,797× 10 ⁶	4,880× 10 ⁶	4,683× 10 ⁶	4,727× 10 ⁶	4,864× 10 ⁶	5,143× 10 ⁶	4,776× 10 ⁶	4,606× 10 ⁶	4,419× 10 ⁶	4,804× 10 ⁶	4,622× 10 ⁶	5,382× 10 ⁶	5,760× 10 ⁶	1,341× 10 ⁶
hsa-miR-4459	3,989× 10 ⁶	3,635× 10 ⁶	4,055× 10 ⁶	4,228× 10 ⁶	5,237× 10 ⁶	5,061× 10 ⁶	4,920× 10 ⁶	4,943× 10 ⁶	5,003× 10 ⁶	5,488× 10 ⁶	5,249× 10 ⁶	5,292× 10 ⁶	5,477× 10 ⁶	1,853× 10 ⁶
hsa-miR-140-5p	5,456× 10 ⁶	5,194× 10 ⁶	4,942× 10 ⁶	4,995× 10 ⁶	4,783× 10 ⁶	4,399× 10 ⁶	4,552× 10 ⁶	3,838× 10 ⁶	3,609× 10 ⁶	3,462× 10 ⁶	3,383× 10 ⁶	3,139× 10 ⁶	3,174× 10 ⁶	2,316× 10 ⁶
hsa-miR-324-3p	5,247× 10 ⁶	5,057× 10 ⁶	5,374× 10 ⁶	5,328× 10 ⁶	5,413× 10 ⁶	4,917× 10 ⁶	5,140× 10 ⁶	4,460× 10 ⁶	4,757× 10 ⁶	4,542× 10 ⁶	4,458× 10 ⁶	4,216× 10 ⁶	4,727× 10 ⁶	1,197× 10 ⁶
hsa-miR-6749-5p	4,090× 10 ⁶	3,885× 10 ⁶	3,936× 10 ⁶	4,208× 10 ⁶	4,255× 10 ⁶	4,229× 10 ⁶	4,388× 10 ⁶	4,123× 10 ⁶	4,290× 10 ⁶	4,230× 10 ⁶	4,572× 10 ⁶	4,621× 10 ⁶	5,110× 10 ⁶	1,225× 10 ⁶
hsa-miR-3960	4,821× 10 ⁶	5,066× 10 ⁶	4,748× 10 ⁶	4,053× 10 ⁶	3,858× 10 ⁶	3,448× 10 ⁶	3,373× 10 ⁶	2,892× 10 ⁶	2,891× 10 ⁶	2,883× 10 ⁶	2,610× 10 ⁶	2,559× 10 ⁶	2,495× 10 ⁶	2,571× 10 ⁶
hsa-miR-1246	9,987× 10 ⁵	1,387× 10 ⁶	1,534× 10 ⁶	1,909× 10 ⁶	2,553× 10 ⁶	2,610× 10 ⁶	3,072× 10 ⁶	3,468× 10 ⁶	3,295× 10 ⁶	3,675× 10 ⁶	4,153× 10 ⁶	4,765× 10 ⁶	4,854× 10 ⁶	3,856× 10 ⁶
hsa-miR-3651	3,766× 10 ⁶	3,752× 10 ⁶	3,683× 10 ⁶	3,726× 10 ⁶	3,934× 10 ⁶	3,714× 10 ⁶	3,852× 10 ⁶	3,786× 10 ⁶	3,833× 10 ⁶	3,763× 10 ⁶	3,999× 10 ⁶	4,038× 10 ⁶	4,403× 10 ⁶	7,192× 10 ⁵
hsa-miR-4485-5p	4,361× 10 ⁶	4,196× 10 ⁶	4,289× 10 ⁶	4,327× 10 ⁶	4,376× 10 ⁶	4,116× 10 ⁶	3,944× 10 ⁶	3,570× 10 ⁶	3,817× 10 ⁶	3,313× 10 ⁶	3,377× 10 ⁶	3,295× 10 ⁶	3,022× 10 ⁶	1,354× 10 ⁶

7. Anhang

miRNA	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h	22 h	24 h	ΔMax
hsa-miR-6875-5p	4,128× 10 ⁶	3,844× 10 ⁶	4,106× 10 ⁶	4,327× 10 ⁶	4,202× 10 ⁶	4,014× 10 ⁶	4,256× 10 ⁶	3,691× 10 ⁶	3,624× 10 ⁶	3,835× 10 ⁶	3,526× 10 ⁶	3,656× 10 ⁶	3,612× 10 ⁶	8,018× 10 ⁵
hsa-miR-4299	4,218× 10 ⁶	3,870× 10 ⁶	4,212× 10 ⁶	4,097× 10 ⁶	4,246× 10 ⁶	4,218× 10 ⁶	3,906× 10 ⁶	3,884× 10 ⁶	4,089× 10 ⁶	4,294× 10 ⁶	4,083× 10 ⁶	3,988× 10 ⁶	4,274× 10 ⁶	4,245× 10 ⁵
hsa-miR-93-5p	4,270× 10 ⁶	3,852× 10 ⁶	3,678× 10 ⁶	3,931× 10 ⁶	3,869× 10 ⁶	3,703× 10 ⁶	3,508× 10 ⁶	3,072× 10 ⁶	3,051× 10 ⁶	3,168× 10 ⁶	3,203× 10 ⁶	3,593× 10 ⁶	3,598× 10 ⁶	1,218× 10 ⁶
hsa-miR-18a-5p	9,174× 10 ⁵	8,854× 10 ⁵	1,186× 10 ⁶	1,848× 10 ⁶	2,348× 10 ⁶	2,658× 10 ⁶	3,001× 10 ⁶	3,388× 10 ⁶	3,130× 10 ⁶	3,373× 10 ⁶	3,867× 10 ⁶	4,188× 10 ⁶	4,171× 10 ⁶	3,303× 10 ⁶
hsa-miR-186-5p	3,879× 10 ⁶	4,008× 10 ⁶	3,890× 10 ⁶	3,911× 10 ⁶	3,791× 10 ⁶	3,507× 10 ⁶	3,436× 10 ⁶	2,941× 10 ⁶	2,903× 10 ⁶	2,816× 10 ⁶	2,704× 10 ⁶	2,420× 10 ⁶	2,612× 10 ⁶	1,588× 10 ⁶
hsa-miR-320d	3,561× 10 ⁶	3,541× 10 ⁶	3,776× 10 ⁶	3,685× 10 ⁶	3,814× 10 ⁶	3,414× 10 ⁶	3,538× 10 ⁶	3,122× 10 ⁶	2,968× 10 ⁶	3,045× 10 ⁶	3,111× 10 ⁶	2,729× 10 ⁶	2,663× 10 ⁶	1,150× 10 ⁶
hsa-miR-17-3p	1,380× 10 ⁶	1,703× 10 ⁶	2,120× 10 ⁶	2,834× 10 ⁶	3,175× 10 ⁶	3,297× 10 ⁶	3,433× 10 ⁶	3,416× 10 ⁶	3,277× 10 ⁶	3,099× 10 ⁶	3,317× 10 ⁶	3,561× 10 ⁶	3,607× 10 ⁶	2,227× 10 ⁶
hsa-miR-192-5p	3,573× 10 ⁶	3,591× 10 ⁶	3,421× 10 ⁶	3,414× 10 ⁶	3,276× 10 ⁶	3,110× 10 ⁶	3,113× 10 ⁶	2,643× 10 ⁶	2,486× 10 ⁶	2,383× 10 ⁶	2,402× 10 ⁶	2,268× 10 ⁶	2,197× 10 ⁶	1,394× 10 ⁶
hsa-miR-361-3p	3,309× 10 ⁶	3,414× 10 ⁶	3,387× 10 ⁶	3,483× 10 ⁶	3,311× 10 ⁶	3,005× 10 ⁶	2,924× 10 ⁶	2,623× 10 ⁶	2,447× 10 ⁶	2,396× 10 ⁶	2,317× 10 ⁶	2,164× 10 ⁶	2,157× 10 ⁶	1,326× 10 ⁶
hsa-miR-3162-5p	2,948× 10 ⁶	3,013× 10 ⁶	3,166× 10 ⁶	3,209× 10 ⁶	3,288× 10 ⁶	3,250× 10 ⁶	3,171× 10 ⁶	3,047× 10 ⁶	3,144× 10 ⁶	2,938× 10 ⁶	3,175× 10 ⁶	3,334× 10 ⁶	3,436× 10 ⁶	4,972× 10 ⁵
hsa-miR-31-5p	3,356× 10 ⁶	3,167× 10 ⁶	3,298× 10 ⁶	3,294× 10 ⁶	3,374× 10 ⁶	3,018× 10 ⁶	3,010× 10 ⁶	2,641× 10 ⁶	2,446× 10 ⁶	2,397× 10 ⁶	2,249× 10 ⁶	2,221× 10 ⁶	2,255× 10 ⁶	1,153× 10 ⁶
hsa-miR-6087	2,771× 10 ⁶	2,732× 10 ⁶	2,963× 10 ⁶	3,016× 10 ⁶	3,273× 10 ⁶	2,923× 10 ⁶	2,875× 10 ⁶	2,706× 10 ⁶	2,793× 10 ⁶	2,970× 10 ⁶	2,703× 10 ⁶	2,916× 10 ⁶	2,898× 10 ⁶	5,702× 10 ⁵
hsa-miR-425-5p	3,272× 10 ⁶	2,965× 10 ⁶	2,804× 10 ⁶	2,818× 10 ⁶	2,797× 10 ⁶	2,509× 10 ⁶	2,522× 10 ⁶	2,157× 10 ⁶	1,991× 10 ⁶	1,921× 10 ⁶	1,760× 10 ⁶	1,721× 10 ⁶	1,741× 10 ⁶	1,550× 10 ⁶
hsa-miR-590-5p	3,235× 10 ⁶	3,271× 10 ⁶	3,094× 10 ⁶	3,218× 10 ⁶	2,993× 10 ⁶	2,825× 10 ⁶	2,868× 10 ⁶	2,424× 10 ⁶	2,343× 10 ⁶	2,314× 10 ⁶	2,252× 10 ⁶	2,122× 10 ⁶	2,150× 10 ⁶	1,149× 10 ⁶
hsa-miR-4516	3,138× 10 ⁶	3,204× 10 ⁶	3,142× 10 ⁶	2,986× 10 ⁶	3,111× 10 ⁶	3,053× 10 ⁶	3,233× 10 ⁶	2,955× 10 ⁶	2,941× 10 ⁶	3,115× 10 ⁶	2,994× 10 ⁶	2,950× 10 ⁶	2,976× 10 ⁶	2,911× 10 ⁵
hsa-miR-374b-5p	3,156× 10 ⁶	3,222× 10 ⁶	2,910× 10 ⁶	3,048× 10 ⁶	2,973× 10 ⁶	2,618× 10 ⁶	2,545× 10 ⁶	2,355× 10 ⁶	2,168× 10 ⁶	2,124× 10 ⁶	1,960× 10 ⁶	1,986× 10 ⁶	1,875× 10 ⁶	1,347× 10 ⁶
hsa-miR-30d-5p	3,189× 10 ⁶	3,131× 10 ⁶	2,979× 10 ⁶	3,190× 10 ⁶	3,113× 10 ⁶	3,005× 10 ⁶	2,891× 10 ⁶	2,512× 10 ⁶	2,433× 10 ⁶	2,303× 10 ⁶	2,280× 10 ⁶	2,141× 10 ⁶	2,306× 10 ⁶	1,049× 10 ⁶
hsa-miR-331-3p	3,179× 10 ⁶	2,984× 10 ⁶	2,973× 10 ⁶	3,165× 10 ⁶	2,986× 10 ⁶	2,818× 10 ⁶	2,952× 10 ⁶	2,543× 10 ⁶	2,399× 10 ⁶	2,435× 10 ⁶	2,549× 10 ⁶	2,488× 10 ⁶	2,610× 10 ⁶	7,799× 10 ⁵
hsa-miR-22-3p	3,036× 10 ⁶	2,937× 10 ⁶	2,817× 10 ⁶	2,993× 10 ⁶	3,175× 10 ⁶	2,854× 10 ⁶	2,994× 10 ⁶	2,626× 10 ⁶	2,505× 10 ⁶	2,523× 10 ⁶	2,418× 10 ⁶	2,324× 10 ⁶	2,529× 10 ⁶	8,502× 10 ⁵
hsa-miR-7114-5p	2,368× 10 ⁶	2,166× 10 ⁶	2,430× 10 ⁶	2,507× 10 ⁶	2,595× 10 ⁶	2,664× 10 ⁶	2,818× 10 ⁶	2,718× 10 ⁶	2,595× 10 ⁶	2,563× 10 ⁶	2,802× 10 ⁶	3,044× 10 ⁶	3,170× 10 ⁶	1,004× 10 ⁶
hsa-miR-125b-5p	3,057× 10 ⁶	3,164× 10 ⁶	3,017× 10 ⁶	3,058× 10 ⁶	2,873× 10 ⁶	2,672× 10 ⁶	2,667× 10 ⁶	2,290× 10 ⁶	2,186× 10 ⁶	1,987× 10 ⁶	2,000× 10 ⁶	1,742× 10 ⁶	1,796× 10 ⁶	1,422× 10 ⁶
hsa-miR-29b-1-5p	7,025× 10 ⁵	1,209× 10 ⁶	1,742× 10 ⁶	2,404× 10 ⁶	2,798× 10 ⁶	2,960× 10 ⁶	3,084× 10 ⁶	2,890× 10 ⁶	2,796× 10 ⁶	2,711× 10 ⁶	2,919× 10 ⁶	2,684× 10 ⁶	2,726× 10 ⁶	2,381× 10 ⁶
hsa-miR-222-3p	2,031× 10 ⁶	1,974× 10 ⁶	1,997× 10 ⁶	2,079× 10 ⁶	2,384× 10 ⁶	2,309× 10 ⁶	2,322× 10 ⁶	2,414× 10 ⁶	2,461× 10 ⁶	2,535× 10 ⁶	2,730× 10 ⁶	2,555× 10 ⁶	2,972× 10 ⁶	9,982× 10 ⁵
hsa-miR-151a-5p	2,879× 10 ⁶	2,815× 10 ⁶	2,682× 10 ⁶	2,736× 10 ⁶	2,663× 10 ⁶	2,486× 10 ⁶	2,446× 10 ⁶	2,050× 10 ⁶	2,087× 10 ⁶	1,912× 10 ⁶	1,883× 10 ⁶	1,659× 10 ⁶	1,772× 10 ⁶	1,220× 10 ⁶
hsa-miR-320b	2,747× 10 ⁶	2,675× 10 ⁶	2,644× 10 ⁶	2,703× 10 ⁶	2,712× 10 ⁶	2,661× 10 ⁶	2,665× 10 ⁶	2,195× 10 ⁶	2,186× 10 ⁶	2,299× 10 ⁶	2,254× 10 ⁶	1,981× 10 ⁶	2,212× 10 ⁶	7,659× 10 ⁵
hsa-miR-6165	2,227× 10 ⁶	2,233× 10 ⁶	2,265× 10 ⁶	2,321× 10 ⁶	2,414× 10 ⁶	2,369× 10 ⁶	2,490× 10 ⁶	2,249× 10 ⁶	2,306× 10 ⁶	2,308× 10 ⁶	2,522× 10 ⁶	2,583× 10 ⁶	2,692× 10 ⁶	4,652× 10 ⁵
hsa-miR-320e	2,589× 10 ⁶	2,556× 10 ⁶	2,539× 10 ⁶	2,654× 10 ⁶	2,630× 10 ⁶	2,533× 10 ⁶	2,670× 10 ⁶	2,130× 10 ⁶	2,165× 10 ⁶	2,184× 10 ⁶	2,176× 10 ⁶	1,845× 10 ⁶	2,121× 10 ⁶	8,246× 10 ⁵
hsa-miR-320c	2,442× 10 ⁶	2,436× 10 ⁶	2,395× 10 ⁶	2,655× 10 ⁶	2,526× 10 ⁶	2,371× 10 ⁶	2,477× 10 ⁶	2,127× 10 ⁶	2,141× 10 ⁶	2,144× 10 ⁶	2,171× 10 ⁶	1,878× 10 ⁶	2,023× 10 ⁶	7,767× 10 ⁵
hsa-miR-6125	1,914× 10 ⁶	1,900× 10 ⁶	2,048× 10 ⁶	2,168× 10 ⁶	2,351× 10 ⁶	2,128× 10 ⁶	2,093× 10 ⁶	2,007× 10 ⁶	2,027× 10 ⁶	2,033× 10 ⁶	1,971× 10 ⁶	1,920× 10 ⁶	1,896× 10 ⁶	4,559× 10 ⁵
hsa-miR-1202	2,116× 10 ⁶	2,208× 10 ⁶	2,209× 10 ⁶	2,240× 10 ⁶	2,345× 10 ⁶	2,134× 10 ⁶	2,130× 10 ⁶	2,125× 10 ⁶	2,087× 10 ⁶	1,963× 10 ⁶	2,207× 10 ⁶	2,045× 10 ⁶	2,173× 10 ⁶	3,821× 10 ⁵
hsa-miR-148a-3p	2,231× 10 ⁶	2,295× 10 ⁶	2,259× 10 ⁶	2,319× 10 ⁶	2,262× 10 ⁶	2,035× 10 ⁶	1,944× 10 ⁶	1,762× 10 ⁶	1,740× 10 ⁶	1,603× 10 ⁶	1,626× 10 ⁶	1,457× 10 ⁶	1,440× 10 ⁶	8,788× 10 ⁵
hsa-miR-215-5p	2,238× 10 ⁶	2,267× 10 ⁶	2,214× 10 ⁶	2,166× 10 ⁶	2,149× 10 ⁶	2,027× 10 ⁶	1,984× 10 ⁶	1,679× 10 ⁶	1,663× 10 ⁶	1,572× 10 ⁶	1,569× 10 ⁶	1,448× 10 ⁶	1,465× 10 ⁶	8,187× 10 ⁵
hsa-miR-6090	2,185× 10 ⁶	2,099× 10 ⁶	2,168× 10 ⁶	2,021× 10 ⁶	2,060× 10 ⁶	1,969× 10 ⁶	2,018× 10 ⁶	1,792× 10 ⁶	1,857× 10 ⁶	2,002× 10 ⁶	1,910× 10 ⁶	1,780× 10 ⁶	1,776× 10 ⁶	4,086× 10 ⁵
hsa-miR-361-5p	2,177× 10 ⁶	2,058× 10 ⁶	1,914× 10 ⁶	1,962× 10 ⁶	1,963× 10 ⁶	1,786× 10 ⁶	1,738× 10 ⁶	1,562× 10 ⁶	1,489× 10 ⁶	1,383× 10 ⁶	1,331× 10 ⁶	1,225× 10 ⁶	1,248× 10 ⁶	9,520× 10 ⁵

7. Anhang

miRNA	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h	22 h	24 h	ΔMax
hsa-miR-6879-5p	2,125× 10 ⁶	2,154× 10 ⁶	2,134× 10 ⁶	2,146× 10 ⁶	2,136× 10 ⁶	2,099× 10 ⁶	2,143× 10 ⁶	1,782× 10 ⁶	1,854× 10 ⁶	1,838× 10 ⁶	1,863× 10 ⁶	1,782× 10 ⁶	1,931× 10 ⁶	3,726× 10 ⁵
hsa-miR-4306	2,153× 10 ⁶	2,131× 10 ⁶	2,017× 10 ⁶	2,050× 10 ⁶	2,050× 10 ⁶	1,863× 10 ⁶	1,893× 10 ⁶	1,570× 10 ⁶	1,583× 10 ⁶	1,528× 10 ⁶	1,475× 10 ⁶	1,351× 10 ⁶	1,470× 10 ⁶	8,025× 10 ⁵
hsa-miR-320a	2,059× 10 ⁶	2,025× 10 ⁶	2,023× 10 ⁶	2,045× 10 ⁶	2,070× 10 ⁶	1,985× 10 ⁶	2,001× 10 ⁶	1,759× 10 ⁶	1,643× 10 ⁶	1,635× 10 ⁶	1,690× 10 ⁶	1,615× 10 ⁶	1,666× 10 ⁶	4,548× 10 ⁵
hsa-miR-132-3p	5,893× 10 ⁵	1,663× 10 ⁶	1,993× 10 ⁶	2,053× 10 ⁶	2,007× 10 ⁶	2,046× 10 ⁶	1,950× 10 ⁶	1,681× 10 ⁶	1,484× 10 ⁶	1,416× 10 ⁶	1,361× 10 ⁶	1,493× 10 ⁶	1,368× 10 ⁶	1,464× 10 ⁶
hsa-miR-20a-3p	9,491× 10 ⁵	1,248× 10 ⁶	1,510× 10 ⁶	1,835× 10 ⁶	2,032× 10 ⁶	1,919× 10 ⁶	1,926× 10 ⁶	1,785× 10 ⁶	1,629× 10 ⁶	1,540× 10 ⁶	1,584× 10 ⁶	1,450× 10 ⁶	1,522× 10 ⁶	1,083× 10 ⁶
hsa-miR-27b-3p	1,964× 10 ⁶	1,955× 10 ⁶	1,918× 10 ⁶	1,971× 10 ⁶	1,827× 10 ⁶	1,753× 10 ⁶	1,749× 10 ⁶	1,503× 10 ⁶	1,465× 10 ⁶	1,399× 10 ⁶	1,311× 10 ⁶	1,234× 10 ⁶	1,283× 10 ⁶	7,363× 10 ⁵
hsa-miR-424-5p	1,965× 10 ⁶	1,961× 10 ⁶	1,824× 10 ⁶	1,919× 10 ⁶	1,915× 10 ⁶	1,837× 10 ⁶	1,661× 10 ⁶	1,585× 10 ⁶	1,642× 10 ⁶	1,385× 10 ⁶	1,421× 10 ⁶	1,293× 10 ⁶	1,230× 10 ⁶	7,353× 10 ⁵
hsa-miR-423-5p	1,898× 10 ⁶	1,840× 10 ⁶	1,837× 10 ⁶	1,906× 10 ⁶	1,957× 10 ⁶	1,817× 10 ⁶	1,667× 10 ⁶	1,539× 10 ⁶	1,486× 10 ⁶	1,493× 10 ⁶	1,412× 10 ⁶	1,354× 10 ⁶	1,331× 10 ⁶	6,266× 10 ⁵
hsa-miR-3607-3p	1,941× 10 ⁶	1,921× 10 ⁶	1,904× 10 ⁶	1,896× 10 ⁶	1,902× 10 ⁶	1,706× 10 ⁶	1,707× 10 ⁶	1,549× 10 ⁶	1,527× 10 ⁶	1,425× 10 ⁶	1,250× 10 ⁶	1,327× 10 ⁶	1,322× 10 ⁶	6,906× 10 ⁵
hsa-miR-4281	1,406× 10 ⁶	1,844× 10 ⁶	1,827× 10 ⁶	1,883× 10 ⁶	1,913× 10 ⁶	1,844× 10 ⁶	1,789× 10 ⁶	1,621× 10 ⁶	1,625× 10 ⁶	1,598× 10 ⁶	1,501× 10 ⁶	1,434× 10 ⁶	1,488× 10 ⁶	5,077× 10 ⁵
hsa-miR-197-5p	1,829× 10 ⁶	1,792× 10 ⁶	1,840× 10 ⁶	1,881× 10 ⁶	1,898× 10 ⁶	1,797× 10 ⁶	1,837× 10 ⁶	1,664× 10 ⁶	1,693× 10 ⁶	1,598× 10 ⁶	1,633× 10 ⁶	1,574× 10 ⁶	1,562× 10 ⁶	3,357× 10 ⁵
hsa-miR-221-3p	1,053× 10 ⁶	1,019× 10 ⁶	1,210× 10 ⁶	1,502× 10 ⁶	1,796× 10 ⁶	1,873× 10 ⁶	1,879× 10 ⁶	1,796× 10 ⁶	1,726× 10 ⁶	1,699× 10 ⁶	1,793× 10 ⁶	1,765× 10 ⁶	1,796× 10 ⁶	8,601× 10 ⁵
hsa-miR-185-5p	1,838× 10 ⁶	1,706× 10 ⁶	1,518× 10 ⁶	1,602× 10 ⁶	1,600× 10 ⁶	1,492× 10 ⁶	1,472× 10 ⁶	1,271× 10 ⁶	1,200× 10 ⁶	1,152× 10 ⁶	1,130× 10 ⁶	1,026× 10 ⁶	1,142× 10 ⁶	8,125× 10 ⁵
hsa-miR-155-3p	4,479× 10 ⁵	6,239× 10 ⁵	1,280× 10 ⁶	1,724× 10 ⁶	1,834× 10 ⁶	1,739× 10 ⁶	1,798× 10 ⁶	1,543× 10 ⁶	1,419× 10 ⁶	1,352× 10 ⁶	1,347× 10 ⁶	1,460× 10 ⁶	1,396× 10 ⁶	1,386× 10 ⁶
hsa-miR-28-5p	1,816× 10 ⁶	1,796× 10 ⁶	1,691× 10 ⁶	1,819× 10 ⁶	1,746× 10 ⁶	1,584× 10 ⁶	1,609× 10 ⁶	1,377× 10 ⁶	1,317× 10 ⁶	1,270× 10 ⁶	1,231× 10 ⁶	1,123× 10 ⁶	1,184× 10 ⁶	6,960× 10 ⁵
hsa-miR-125a-5p	1,795× 10 ⁶	1,719× 10 ⁶	1,686× 10 ⁶	1,692× 10 ⁶	1,665× 10 ⁶	1,528× 10 ⁶	1,458× 10 ⁶	1,380× 10 ⁶	1,267× 10 ⁶	1,260× 10 ⁶	1,177× 10 ⁶	1,222× 10 ⁶	1,232× 10 ⁶	6,179× 10 ⁵
hsa-miR-194-5p	1,777× 10 ⁶	1,760× 10 ⁶	1,795× 10 ⁶	1,753× 10 ⁶	1,738× 10 ⁶	1,630× 10 ⁶	1,549× 10 ⁶	1,345× 10 ⁶	1,225× 10 ⁶	1,271× 10 ⁶	1,255× 10 ⁶	1,104× 10 ⁶	1,172× 10 ⁶	6,907× 10 ⁵
hsa-miR-7-5p	1,015× 10 ⁶	1,019× 10 ⁶	1,067× 10 ⁶	1,226× 10 ⁶	1,256× 10 ⁶	1,277× 10 ⁶	1,401× 10 ⁶	1,303× 10 ⁶	1,354× 10 ⁶	1,443× 10 ⁶	1,581× 10 ⁶	1,739× 10 ⁶	1,789× 10 ⁶	7,736× 10 ⁵
hsa-miR-99a-5p	1,704× 10 ⁶	1,777× 10 ⁶	1,756× 10 ⁶	1,774× 10 ⁶	1,765× 10 ⁶	1,590× 10 ⁶	1,559× 10 ⁶	1,317× 10 ⁶	1,293× 10 ⁶	1,253× 10 ⁶	1,194× 10 ⁶	1,109× 10 ⁶	1,192× 10 ⁶	6,681× 10 ⁵
hsa-miR-660-5p	1,755× 10 ⁶	1,641× 10 ⁶	1,589× 10 ⁶	1,635× 10 ⁶	1,656× 10 ⁶	1,562× 10 ⁶	1,559× 10 ⁶	1,453× 10 ⁶	1,284× 10 ⁶	1,326× 10 ⁶	1,279× 10 ⁶	1,201× 10 ⁶	1,195× 10 ⁶	5,592× 10 ⁵
hsa-miR-30e-3p	1,706× 10 ⁶	1,701× 10 ⁶	1,565× 10 ⁶	1,522× 10 ⁶	1,539× 10 ⁶	1,407× 10 ⁶	1,479× 10 ⁶	1,268× 10 ⁶	1,172× 10 ⁶	1,080× 10 ⁶	1,062× 10 ⁶	1,010× 10 ⁶	1,057× 10 ⁶	6,958× 10 ⁵
hsa-miR-3196	1,266× 10 ⁶	1,245× 10 ⁶	1,278× 10 ⁶	1,350× 10 ⁶	1,405× 10 ⁶	1,424× 10 ⁶	1,449× 10 ⁶	1,460× 10 ⁶	1,407× 10 ⁶	1,430× 10 ⁶	1,530× 10 ⁶	1,597× 10 ⁶	1,695× 10 ⁶	4,490× 10 ⁵
hsa-miR-23b-3p	1,639× 10 ⁶	1,617× 10 ⁶	1,587× 10 ⁶	1,681× 10 ⁶	1,600× 10 ⁶	1,518× 10 ⁶	1,439× 10 ⁶	1,338× 10 ⁶	1,272× 10 ⁶	1,182× 10 ⁶	1,163× 10 ⁶	1,060× 10 ⁶	1,080× 10 ⁶	6,210× 10 ⁵
hsa-miR-6740-5p	1,498× 10 ⁶	1,476× 10 ⁶	1,565× 10 ⁶	1,617× 10 ⁶	1,610× 10 ⁶	1,547× 10 ⁶	1,645× 10 ⁶	1,380× 10 ⁶	1,360× 10 ⁶	1,333× 10 ⁶	1,316× 10 ⁶	1,289× 10 ⁶	1,388× 10 ⁶	3,567× 10 ⁵
hsa-miR-7-1-3p	1,619× 10 ⁶	1,516× 10 ⁶	1,524× 10 ⁶	1,522× 10 ⁶	1,514× 10 ⁶	1,411× 10 ⁶	1,433× 10 ⁶	1,349× 10 ⁶	1,230× 10 ⁶	1,246× 10 ⁶	1,203× 10 ⁶	1,281× 10 ⁶	1,278× 10 ⁶	4,161× 10 ⁵
hsa-miR-4505	1,492× 10 ⁶	1,376× 10 ⁶	1,538× 10 ⁶	1,558× 10 ⁶	1,607× 10 ⁶	1,558× 10 ⁶	1,474× 10 ⁶	1,446× 10 ⁶	1,512× 10 ⁶	1,601× 10 ⁶	1,453× 10 ⁶	1,469× 10 ⁶	1,535× 10 ⁶	2,309× 10 ⁵
hsa-miR-151b	1,598× 10 ⁶	1,522× 10 ⁶	1,498× 10 ⁶	1,552× 10 ⁶	1,556× 10 ⁶	1,424× 10 ⁶	1,404× 10 ⁶	1,227× 10 ⁶	1,216× 10 ⁶	1,154× 10 ⁶	1,135× 10 ⁶	1,090× 10 ⁶	1,083× 10 ⁶	5,144× 10 ⁵
hsa-miR-4713-3p	1,474× 10 ⁶	1,430× 10 ⁶	1,527× 10 ⁶	1,597× 10 ⁶	1,535× 10 ⁶	1,489× 10 ⁶	1,436× 10 ⁶	1,304× 10 ⁶	1,283× 10 ⁶	1,233× 10 ⁶	1,215× 10 ⁶	1,191× 10 ⁶	1,305× 10 ⁶	4,063× 10 ⁵
hsa-miR-574-5p	1,200× 10 ⁶	1,258× 10 ⁶	1,306× 10 ⁶	1,362× 10 ⁶	1,570× 10 ⁶	1,479× 10 ⁶	1,522× 10 ⁶	1,356× 10 ⁶	1,323× 10 ⁶	1,229× 10 ⁶	1,273× 10 ⁶	1,231× 10 ⁶	1,242× 10 ⁶	3,706× 10 ⁵
hsa-miR-642a-3p	1,255× 10 ⁶	1,445× 10 ⁶	1,433× 10 ⁶	1,407× 10 ⁶	1,541× 10 ⁶	1,456× 10 ⁶	1,498× 10 ⁶	1,336× 10 ⁶	1,385× 10 ⁶	1,407× 10 ⁶	1,422× 10 ⁶	1,394× 10 ⁶	1,401× 10 ⁶	2,861× 10 ⁵
hsa-miR-130a-3p	1,530× 10 ⁶	1,365× 10 ⁶	1,317× 10 ⁶	1,370× 10 ⁶	1,348× 10 ⁶	1,238× 10 ⁶	1,159× 10 ⁶	1,056× 10 ⁶	1,102× 10 ⁶	9,996× 10 ⁵	9,786× 10 ⁵	9,544× 10 ⁵	9,041× 10 ⁵	6,256× 10 ⁵
hsa-let-7e-5p	1,519× 10 ⁶	1,497× 10 ⁶	1,484× 10 ⁶	1,483× 10 ⁶	1,475× 10 ⁶	1,412× 10 ⁶	1,362× 10 ⁶	1,178× 10 ⁶	1,164× 10 ⁶	1,182× 10 ⁶	1,182× 10 ⁶	1,123× 10 ⁶	1,135× 10 ⁶	3,960× 10 ⁵
hsa-miR-4530	1,295× 10 ⁶	1,455× 10 ⁶	1,503× 10 ⁶	1,452× 10 ⁶	1,502× 10 ⁶	1,433× 10 ⁶	1,394× 10 ⁶	1,399× 10 ⁶	1,352× 10 ⁶	1,345× 10 ⁶	1,270× 10 ⁶	1,349× 10 ⁶	1,374× 10 ⁶	2,334× 10 ⁵
hsa-miR-197-3p	1,424× 10 ⁶	1,407× 10 ⁶	1,413× 10 ⁶	1,495× 10 ⁶	1,441× 10 ⁶	1,344× 10 ⁶	1,310× 10 ⁶	1,188× 10 ⁶	1,168× 10 ⁶	1,126× 10 ⁶	1,094× 10 ⁶	1,036× 10 ⁶	1,085× 10 ⁶	4,587× 10 ⁵

7. Anhang

miRNA	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h	22 h	24 h	ΔMax
hsa-miR-1290	5,884×10 ⁵	7,828×10 ⁵	9,245×10 ⁵	1,074×10 ⁶	1,288×10 ⁶	1,325×10 ⁶	1,291×10 ⁶	1,245×10 ⁶	1,350×10 ⁶	1,318×10 ⁶	1,358×10 ⁶	1,478×10 ⁶	1,419×10 ⁶	8,892×10 ⁵
hsa-miR-378i	1,454×10 ⁶	1,252×10 ⁶	1,201×10 ⁶	1,316×10 ⁶	1,387×10 ⁶	1,303×10 ⁶	1,316×10 ⁶	1,212×10 ⁶	1,143×10 ⁶	1,131×10 ⁶	1,171×10 ⁶	1,143×10 ⁶	1,122×10 ⁶	3,311×10 ⁵
hsa-miR-181b-5p	1,379×10 ⁶	1,337×10 ⁶	1,453×10 ⁶	1,405×10 ⁶	1,435×10 ⁶	1,366×10 ⁶	1,245×10 ⁶	1,139×10 ⁶	1,069×10 ⁶	1,006×10 ⁶	9,788×10 ⁵	1,021×10 ⁶	1,021×10 ⁶	4,738×10 ⁵
hsa-miR-1275	1,444×10 ⁶	1,417×10 ⁶	1,427×10 ⁶	1,367×10 ⁶	1,326×10 ⁶	1,262×10 ⁶	1,247×10 ⁶	1,119×10 ⁶	1,076×10 ⁶	1,053×10 ⁶	1,066×10 ⁶	1,021×10 ⁶	9,990×10 ⁵	4,455×10 ⁵
hsa-miR-4443	1,383×10 ⁶	1,041×10 ⁶	1,058×10 ⁶	1,096×10 ⁶	1,156×10 ⁶	1,217×10 ⁶	1,202×10 ⁶	1,166×10 ⁶	1,129×10 ⁶	1,142×10 ⁶	1,230×10 ⁶	1,223×10 ⁶	1,370×10 ⁶	3,425×10 ⁵
hsa-miR-6869-5p	1,126×10 ⁶	1,165×10 ⁶	1,310×10 ⁶	1,289×10 ⁶	1,381×10 ⁶	1,371×10 ⁶	1,313×10 ⁶	1,313×10 ⁶	1,267×10 ⁶	1,373×10 ⁶	1,246×10 ⁶	1,249×10 ⁶	1,246×10 ⁶	2,551×10 ⁵
hsa-miR-625-5p	1,351×10 ⁶	1,379×10 ⁶	1,329×10 ⁶	1,359×10 ⁶	1,292×10 ⁶	1,193×10 ⁶	1,163×10 ⁶	1,081×10 ⁶	1,119×10 ⁶	1,063×10 ⁶	9,904×10 ⁵	9,301×10 ⁵	8,945×10 ⁵	4,843×10 ⁵
hsa-miR-6803-5p	1,149×10 ⁶	1,108×10 ⁶	1,225×10 ⁶	1,243×10 ⁶	1,350×10 ⁶	1,310×10 ⁶	1,270×10 ⁶	1,263×10 ⁶	1,271×10 ⁶	1,236×10 ⁶	1,236×10 ⁶	1,253×10 ⁶	1,288×10 ⁶	2,417×10 ⁵
hsa-miR-874-3p	1,268×10 ⁶	1,334×10 ⁶	1,287×10 ⁶	1,279×10 ⁶	1,224×10 ⁶	1,147×10 ⁶	1,142×10 ⁶	1,035×10 ⁶	9,768×10 ⁵	9,143×10 ⁵	8,694×10 ⁵	8,302×10 ⁵	8,799×10 ⁵	5,038×10 ⁵
hsa-miR-365a-3p	1,247×10 ⁶	1,213×10 ⁶	1,244×10 ⁶	1,295×10 ⁶	1,322×10 ⁶	1,271×10 ⁶	1,256×10 ⁶	1,170×10 ⁶	1,098×10 ⁶	1,002×10 ⁶	1,018×10 ⁶	1,005×10 ⁶	9,643×10 ⁵	3,579×10 ⁵
hsa-miR-766-3p	1,272×10 ⁶	1,303×10 ⁶	1,255×10 ⁶	1,241×10 ⁶	1,317×10 ⁶	1,245×10 ⁶	1,215×10 ⁶	1,175×10 ⁶	1,129×10 ⁶	1,104×10 ⁶	1,107×10 ⁶	1,090×10 ⁶	1,032×10 ⁶	2,845×10 ⁵
hsa-miR-6717-5p	1,192×10 ⁶	1,145×10 ⁶	1,259×10 ⁶	1,304×10 ⁶	1,218×10 ⁶	1,230×10 ⁶	1,233×10 ⁶	1,075×10 ⁶	1,040×10 ⁶	1,053×10 ⁶	1,015×10 ⁶	1,007×10 ⁶	1,106×10 ⁶	2,973×10 ⁵
hsa-miR-18b-5p	5,893×10 ⁵	5,701×10 ⁵	6,450×10 ⁵	7,687×10 ⁵	9,034×10 ⁵	9,614×10 ⁵	1,037×10 ⁶	1,079×10 ⁶	1,032×10 ⁶	1,049×10 ⁶	1,123×10 ⁶	1,219×10 ⁶	1,297×10 ⁶	7,266×10 ⁵
hsa-miR-7704	1,032×10 ⁶	1,047×10 ⁶	1,145×10 ⁶	1,224×10 ⁶	1,286×10 ⁶	1,250×10 ⁶	1,137×10 ⁶	1,111×10 ⁶	1,145×10 ⁶	1,138×10 ⁶	1,054×10 ⁶	1,057×10 ⁶	1,080×10 ⁶	2,541×10 ⁵
hsa-miR-29c-5p	1,271×10 ⁶	1,221×10 ⁶	1,201×10 ⁶	1,224×10 ⁶	1,235×10 ⁶	1,166×10 ⁶	1,152×10 ⁶	1,032×10 ⁶	9,592×10 ⁵	9,521×10 ⁵	9,181×10 ⁵	9,336×10 ⁵	9,017×10 ⁵	3,692×10 ⁵
hsa-miR-6780b-5p	1,211×10 ⁶	1,157×10 ⁶	1,243×10 ⁶	1,263×10 ⁶	1,217×10 ⁶	1,197×10 ⁶	1,186×10 ⁶	1,074×10 ⁶	1,122×10 ⁶	1,124×10 ⁶	1,132×10 ⁶	1,144×10 ⁶	1,210×10 ⁶	1,897×10 ⁵
hsa-miR-6821-5p	1,227×10 ⁶	1,251×10 ⁶	1,263×10 ⁶	1,203×10 ⁶	1,197×10 ⁶	1,169×10 ⁶	1,134×10 ⁶	1,057×10 ⁶	1,001×10 ⁶	1,012×10 ⁶	9,391×10 ⁵	9,475×10 ⁵	9,424×10 ⁵	3,239×10 ⁵
hsa-miR-2861	9,674×10 ⁵	9,900×10 ⁵	1,079×10 ⁶	1,098×10 ⁶	1,242×10 ⁶	1,152×10 ⁶	1,134×10 ⁶	1,087×10 ⁶	1,079×10 ⁶	1,066×10 ⁶	1,027×10 ⁶	1,021×10 ⁶	1,021×10 ⁶	2,745×10 ⁵
hsa-miR-211-3p	1,056×10 ⁶	9,981×10 ⁵	9,961×10 ⁵	1,044×10 ⁶	1,053×10 ⁶	1,055×10 ⁶	1,061×10 ⁶	1,043×10 ⁶	1,023×10 ⁶	1,027×10 ⁶	1,097×10 ⁶	1,123×10 ⁶	1,234×10 ⁶	2,383×10 ⁵
hsa-miR-98-5p	1,141×10 ⁶	1,056×10 ⁶	1,086×10 ⁶	1,210×10 ⁶	1,173×10 ⁶	1,117×10 ⁶	1,114×10 ⁶	1,077×10 ⁶	1,013×10 ⁶	1,040×10 ⁶	9,688×10 ⁵	1,014×10 ⁶	1,010×10 ⁶	2,412×10 ⁵
hsa-miR-32-5p	1,151×10 ⁶	1,172×10 ⁶	1,096×10 ⁶	1,208×10 ⁶	1,157×10 ⁶	1,097×10 ⁶	1,097×10 ⁶	1,022×10 ⁶	9,609×10 ⁵	9,156×10 ⁵	8,918×10 ⁵	8,472×10 ⁵	9,163×10 ⁵	3,603×10 ⁵
hsa-miR-3665	1,118×10 ⁶	1,194×10 ⁶	1,195×10 ⁶	1,158×10 ⁶	1,125×10 ⁶	1,066×10 ⁶	1,018×10 ⁶	9,494×10 ⁵	9,025×10 ⁵	8,743×10 ⁵	8,299×10 ⁵	8,730×10 ⁵	9,198×10 ⁵	3,649×10 ⁵
hsa-miR-130b-3p	1,194×10 ⁶	1,104×10 ⁶	1,056×10 ⁶	1,053×10 ⁶	1,142×10 ⁶	1,032×10 ⁶	1,074×10 ⁶	9,491×10 ⁵	9,141×10 ⁵	9,091×10 ⁵	9,090×10 ⁵	9,272×10 ⁵	9,580×10 ⁵	2,855×10 ⁵
hsa-miR-5701	1,183×10 ⁶	1,110×10 ⁶	1,192×10 ⁶	1,178×10 ⁶	1,150×10 ⁶	1,091×10 ⁶	1,051×10 ⁶	1,001×10 ⁶	9,363×10 ⁵	8,972×10 ⁵	8,360×10 ⁵	8,678×10 ⁵	9,260×10 ⁵	3,564×10 ⁵
hsa-miR-939-5p	1,009×10 ⁶	9,709×10 ⁵	1,073×10 ⁶	1,068×10 ⁶	1,095×10 ⁶	1,083×10 ⁶	1,087×10 ⁶	1,080×10 ⁶	1,074×10 ⁶	1,053×10 ⁶	1,104×10 ⁶	1,184×10 ⁶	1,189×10 ⁶	2,180×10 ⁵
hsa-miR-6131	1,102×10 ⁶	1,049×10 ⁶	1,148×10 ⁶	1,183×10 ⁶	1,151×10 ⁶	1,132×10 ⁶	1,122×10 ⁶	1,035×10 ⁶	1,011×10 ⁶	9,890×10 ⁵	1,013×10 ⁶	1,026×10 ⁶	1,054×10 ⁶	1,944×10 ⁵
hsa-miR-6800-5p	1,060×10 ⁶	1,111×10 ⁶	1,181×10 ⁶	1,134×10 ⁶	1,165×10 ⁶	1,121×10 ⁶	1,106×10 ⁶	1,033×10 ⁶	1,056×10 ⁶	1,069×10 ⁶	1,001×10 ⁶	1,011×10 ⁶	9,772×10 ⁵	2,043×10 ⁵
hsa-miR-940	1,154×10 ⁶	1,158×10 ⁶	1,176×10 ⁶	1,138×10 ⁶	1,144×10 ⁶	1,158×10 ⁶	1,130×10 ⁶	1,108×10 ⁶	1,099×10 ⁶	1,103×10 ⁶	1,087×10 ⁶	1,107×10 ⁶	1,095×10 ⁶	8,965×10 ⁴
hsa-miR-193b-3p	1,137×10 ⁶	1,074×10 ⁶	1,084×10 ⁶	1,153×10 ⁶	1,172×10 ⁶	1,134×10 ⁶	1,140×10 ⁶	1,037×10 ⁶	9,922×10 ⁵	9,972×10 ⁵	1,015×10 ⁶	9,509×10 ⁵	1,010×10 ⁶	2,210×10 ⁵
hsa-miR-3198	1,082×10 ⁶	1,036×10 ⁶	1,157×10 ⁶	1,162×10 ⁶	1,121×10 ⁶	1,109×10 ⁶	1,075×10 ⁶	9,864×10 ⁵	9,629×10 ⁵	9,468×10 ⁵	9,317×10 ⁵	9,095×10 ⁵	1,059×10 ⁶	2,523×10 ⁵
hsa-miR-4653-3p	1,091×10 ⁶	1,048×10 ⁶	1,141×10 ⁶	1,160×10 ⁶	1,144×10 ⁶	1,123×10 ⁶	1,049×10 ⁶	1,005×10 ⁶	9,922×10 ⁵	9,389×10 ⁵	9,563×10 ⁵	9,271×10 ⁵	1,070×10 ⁶	2,330×10 ⁵
hsa-miR-378a-3p	1,142×10 ⁶	9,642×10 ⁵	9,139×10 ⁵	1,001×10 ⁶	1,032×10 ⁶	1,011×10 ⁶	1,029×10 ⁶	9,651×10 ⁵	8,691×10 ⁵	8,353×10 ⁵	8,799×10 ⁵	8,838×10 ⁵	8,949×10 ⁵	3,065×10 ⁵
hsa-miR-664a-3p	1,075×10 ⁶	1,086×10 ⁶	1,091×10 ⁶	1,068×10 ⁶	1,128×10 ⁶	1,069×10 ⁶	1,048×10 ⁶	9,708×10 ⁵	9,317×10 ⁵	8,905×10 ⁵	8,829×10 ⁵	8,835×10 ⁵	8,903×10 ⁵	2,455×10 ⁵
hsa-miR-1268a	9,286×10 ⁵	9,564×10 ⁵	1,012×10 ⁶	1,044×10 ⁶	1,127×10 ⁶	1,062×10 ⁶	1,013×10 ⁶	9,695×10 ⁵	9,540×10 ⁵	9,890×10 ⁵	1,012×10 ⁶	9,825×10 ⁵	9,702×10 ⁵	1,985×10 ⁵

7. Anhang

miRNA	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h	22 h	24 h	Δ Max
hsa-miR-630	4,589× 10 ⁵	5,243× 10 ⁵	6,482× 10 ⁵	7,479× 10 ⁵	9,065× 10 ⁵	9,776× 10 ⁵	1,007× 10 ⁶	9,677× 10 ⁵	9,647× 10 ⁵	1,075× 10 ⁶	1,012× 10 ⁶	1,115× 10 ⁶	1,120× 10 ⁶	6,608× 10 ⁵
hsa-miR-1225-5p	9,905× 10 ⁵	1,059× 10 ⁶	1,054× 10 ⁶	1,041× 10 ⁶	1,116× 10 ⁶	1,033× 10 ⁶	9,938× 10 ⁵	9,104× 10 ⁵	9,471× 10 ⁵	9,076× 10 ⁵	9,233× 10 ⁵	8,589× 10 ⁵	8,728× 10 ⁵	2,573× 10 ⁵
hsa-miR-4687-3p	8,479× 10 ⁵	9,529× 10 ⁵	1,040× 10 ⁶	1,002× 10 ⁶	1,055× 10 ⁶	1,033× 10 ⁶	1,110× 10 ⁶	1,008× 10 ⁶	1,034× 10 ⁶	1,073× 10 ⁶	1,040× 10 ⁶	1,054× 10 ⁶	1,087× 10 ⁶	2,617× 10 ⁵
hsa-miR-6829-5p	8,609× 10 ⁵	8,669× 10 ⁵	9,010× 10 ⁵	9,028× 10 ⁵	9,399× 10 ⁵	9,410× 10 ⁵	9,357× 10 ⁵	9,177× 10 ⁵	9,401× 10 ⁵	8,917× 10 ⁵	1,013× 10 ⁶	1,007× 10 ⁶	1,099× 10 ⁶	2,379× 10 ⁵
hsa-miR-126-3p	1,095× 10 ⁶	8,809× 10 ⁵	9,065× 10 ⁵	9,288× 10 ⁵	9,334× 10 ⁵	8,699× 10 ⁵	8,063× 10 ⁵	7,664× 10 ⁵	7,719× 10 ⁵	7,557× 10 ⁵	7,598× 10 ⁵	6,956× 10 ⁵	7,330× 10 ⁵	3,989× 10 ⁵
hsa-miR-3195	9,686× 10 ⁵	9,095× 10 ⁵	9,759× 10 ⁵	9,898× 10 ⁵	1,051× 10 ⁶	1,028× 10 ⁶	9,957× 10 ⁵	9,938× 10 ⁵	1,011× 10 ⁶	1,031× 10 ⁶	1,035× 10 ⁶	1,023× 10 ⁶	1,094× 10 ⁶	1,840× 10 ⁵
hsa-miR-4484	9,039× 10 ⁵	1,011× 10 ⁶	1,029× 10 ⁶	1,004× 10 ⁶	1,093× 10 ⁶	1,037× 10 ⁶	1,026× 10 ⁶	9,712× 10 ⁵	9,530× 10 ⁵	9,545× 10 ⁵	9,491× 10 ⁵	9,445× 10 ⁵	9,116× 10 ⁵	1,893× 10 ⁵
hsa-miR-362-3p	1,071× 10 ⁶	1,059× 10 ⁶	1,032× 10 ⁶	1,050× 10 ⁶	1,087× 10 ⁶	1,022× 10 ⁶	1,034× 10 ⁶	9,402× 10 ⁵	8,585× 10 ⁵	8,791× 10 ⁵	8,386× 10 ⁵	8,016× 10 ⁵	8,139× 10 ⁵	2,855× 10 ⁵
hsa-miR-128-3p	1,017× 10 ⁶	1,009× 10 ⁶	9,959× 10 ⁵	1,044× 10 ⁶	1,078× 10 ⁶	1,001× 10 ⁶	9,835× 10 ⁵	8,705× 10 ⁵	8,515× 10 ⁵	8,236× 10 ⁵	8,469× 10 ⁵	7,912× 10 ⁵	7,749× 10 ⁵	3,035× 10 ⁵
hsa-miR-1305	1,004× 10 ⁶	9,553× 10 ⁵	1,059× 10 ⁶	1,076× 10 ⁶	1,062× 10 ⁶	1,042× 10 ⁶	1,031× 10 ⁶	9,031× 10 ⁵	9,108× 10 ⁵	8,808× 10 ⁵	8,501× 10 ⁵	8,667× 10 ⁵	9,564× 10 ⁵	2,261× 10 ⁵
hsa-miR-532-5p	1,076× 10 ⁶	1,052× 10 ⁶	9,978× 10 ⁵	1,028× 10 ⁶	1,075× 10 ⁶	9,870× 10 ⁵	9,783× 10 ⁵	9,142× 10 ⁵	8,342× 10 ⁵	7,975× 10 ⁵	7,890× 10 ⁵	7,686× 10 ⁵	7,860× 10 ⁵	3,073× 10 ⁵
hsa-miR-4665-3p	1,010× 10 ⁶	1,023× 10 ⁶	1,045× 10 ⁶	1,037× 10 ⁶	1,054× 10 ⁶	1,065× 10 ⁶	1,031× 10 ⁶	1,020× 10 ⁶	9,883× 10 ⁵	1,018× 10 ⁶	1,001× 10 ⁶	1,017× 10 ⁶	1,034× 10 ⁶	7,689× 10 ⁴
hsa-miR-6124	9,539× 10 ⁵	1,009× 10 ⁶	1,030× 10 ⁶	1,012× 10 ⁶	1,059× 10 ⁶	1,030× 10 ⁶	9,704× 10 ⁵	9,048× 10 ⁵	9,071× 10 ⁵	9,152× 10 ⁵	9,275× 10 ⁵	8,678× 10 ⁵	9,382× 10 ⁵	1,915× 10 ⁵
hsa-miR-6831-5p	6,799× 10 ⁵	8,475× 10 ⁵	1,055× 10 ⁶	8,173× 10 ⁵	9,760× 10 ⁵	8,350× 10 ⁵	9,392× 10 ⁵	8,074× 10 ⁵	7,268× 10 ⁵	6,387× 10 ⁵	7,462× 10 ⁵	6,667× 10 ⁵	5,859× 10 ⁵	4,691× 10 ⁵
hsa-miR-454-3p	1,052× 10 ⁶	9,670× 10 ⁵	9,864× 10 ⁵	9,695× 10 ⁵	9,968× 10 ⁵	9,116× 10 ⁵	9,451× 10 ⁵	8,119× 10 ⁵	7,717× 10 ⁵	7,910× 10 ⁵	7,323× 10 ⁵	7,165× 10 ⁵	7,420× 10 ⁵	3,357× 10 ⁵
hsa-miR-5787	6,231× 10 ⁵	6,835× 10 ⁵	7,176× 10 ⁵	7,657× 10 ⁵	9,320× 10 ⁵	9,706× 10 ⁵	9,888× 10 ⁵	9,402× 10 ⁵	9,560× 10 ⁵	9,308× 10 ⁵	9,812× 10 ⁵	9,410× 10 ⁵	1,040× 10 ⁶	4,166× 10 ⁵
hsa-miR-6763-5p	9,126× 10 ⁵	9,051× 10 ⁵	9,210× 10 ⁵	9,636× 10 ⁵	9,976× 10 ⁵	9,941× 10 ⁵	9,948× 10 ⁵	9,500× 10 ⁵	9,432× 10 ⁵	9,351× 10 ⁵	9,851× 10 ⁵	1,023× 10 ⁶	1,040× 10 ⁶	1,346× 10 ⁵
hsa-miR-4313	9,869× 10 ⁵	1,025× 10 ⁶	1,010× 10 ⁶	1,013× 10 ⁶	1,035× 10 ⁶	1,031× 10 ⁶	1,014× 10 ⁶	1,028× 10 ⁶	1,003× 10 ⁶	1,011× 10 ⁶	9,947× 10 ⁵	1,038× 10 ⁶	9,892× 10 ⁵	5,149× 10 ⁴
hsa-miR-144-3p	7,345× 10 ⁵	7,212× 10 ⁵	9,326× 10 ⁵	1,030× 10 ⁶	9,897× 10 ⁵	8,828× 10 ⁵	9,117× 10 ⁵	8,958× 10 ⁵	7,582× 10 ⁵	7,405× 10 ⁵	7,131× 10 ⁵	7,083× 10 ⁵	6,855× 10 ⁵	3,446× 10 ⁵
hsa-miR-3162-3p	9,816× 10 ⁵	9,937× 10 ⁵	1,009× 10 ⁶	1,021× 10 ⁶	1,021× 10 ⁶	1,012× 10 ⁶	1,027× 10 ⁶	1,009× 10 ⁶	9,694× 10 ⁵	9,889× 10 ⁵	9,751× 10 ⁵	9,822× 10 ⁵	9,857× 10 ⁵	5,751× 10 ⁴
hsa-miR-6893-5p	9,438× 10 ⁵	9,477× 10 ⁵	9,505× 10 ⁵	9,753× 10 ⁵	1,026× 10 ⁶	9,601× 10 ⁵	9,485× 10 ⁵	9,342× 10 ⁵	9,309× 10 ⁵	9,094× 10 ⁵	8,993× 10 ⁵	9,443× 10 ⁵	9,563× 10 ⁵	1,266× 10 ⁵
hsa-miR-4428	9,109× 10 ⁵	9,692× 10 ⁵	9,538× 10 ⁵	9,666× 10 ⁵	1,025× 10 ⁶	9,957× 10 ⁵	9,290× 10 ⁵	9,294× 10 ⁵	9,101× 10 ⁵	9,080× 10 ⁵	8,333× 10 ⁵	9,425× 10 ⁵	1,012× 10 ⁶	1,916× 10 ⁵
hsa-miR-6734-5p	9,348× 10 ⁵	9,112× 10 ⁵	1,007× 10 ⁶	1,024× 10 ⁶	9,846× 10 ⁵	9,836× 10 ⁵	9,411× 10 ⁵	8,779× 10 ⁵	8,622× 10 ⁵	8,426× 10 ⁵	8,605× 10 ⁵	8,146× 10 ⁵	9,084× 10 ⁵	2,099× 10 ⁵
hsa-miR-324-5p	9,046× 10 ⁵	8,090× 10 ⁵	8,007× 10 ⁵	8,298× 10 ⁵	8,982× 10 ⁵	9,220× 10 ⁵	9,252× 10 ⁵	9,176× 10 ⁵	8,550× 10 ⁵	8,743× 10 ⁵	9,174× 10 ⁵	9,657× 10 ⁵	1,022× 10 ⁶	2,218× 10 ⁵
hsa-miR-141-3p	1,008× 10 ⁶	1,021× 10 ⁶	9,543× 10 ⁵	9,701× 10 ⁵	9,681× 10 ⁵	9,532× 10 ⁵	9,259× 10 ⁵	8,771× 10 ⁵	7,699× 10 ⁵	7,975× 10 ⁵	7,961× 10 ⁵	7,391× 10 ⁵	7,670× 10 ⁵	2,818× 10 ⁵
hsa-miR-762	7,098× 10 ⁵	7,730× 10 ⁵	8,674× 10 ⁵	8,890× 10 ⁵	9,070× 10 ⁵	9,497× 10 ⁵	1,014× 10 ⁶	8,392× 10 ⁵	9,227× 10 ⁵	1,021× 10 ⁶	9,605× 10 ⁵	9,681× 10 ⁵	8,883× 10 ⁵	3,107× 10 ⁵
hsa-miR-6088	8,810× 10 ⁵	1,015× 10 ⁶	9,949× 10 ⁵	9,575× 10 ⁵	9,539× 10 ⁵	8,906× 10 ⁵	8,725× 10 ⁵	8,323× 10 ⁵	8,215× 10 ⁵	8,246× 10 ⁵	7,931× 10 ⁵	7,758× 10 ⁵	7,931× 10 ⁵	2,387× 10 ⁵
hsa-miR-6819-3p	9,492× 10 ⁵	9,837× 10 ⁵	9,561× 10 ⁵	9,818× 10 ⁵	1,005× 10 ⁶	1,000× 10 ⁶	9,921× 10 ⁵	1,000× 10 ⁶	9,605× 10 ⁵	1,012× 10 ⁶	1,003× 10 ⁶	1,003× 10 ⁶	9,944× 10 ⁵	6,296× 10 ⁴
hsa-miR-340-5p	1,008× 10 ⁶	8,824× 10 ⁵	8,712× 10 ⁵	8,815× 10 ⁵	8,974× 10 ⁵	8,537× 10 ⁵	8,412× 10 ⁵	7,527× 10 ⁵	7,227× 10 ⁵	6,799× 10 ⁵	6,368× 10 ⁵	6,618× 10 ⁵	6,594× 10 ⁵	3,717× 10 ⁵
hsa-miR-1268b	8,823× 10 ⁵	9,112× 10 ⁵	9,802× 10 ⁵	9,671× 10 ⁵	1,007× 10 ⁶	9,523× 10 ⁵	8,995× 10 ⁵	8,921× 10 ⁵	8,620× 10 ⁵	8,683× 10 ⁵	8,594× 10 ⁵	8,684× 10 ⁵	8,657× 10 ⁵	1,473× 10 ⁵
hsa-miR-1234-3p	9,347× 10 ⁵	9,628× 10 ⁵	9,665× 10 ⁵	9,801× 10 ⁵	9,945× 10 ⁵	1,003× 10 ⁶	9,661× 10 ⁵	9,781× 10 ⁵	9,362× 10 ⁵	9,542× 10 ⁵	9,647× 10 ⁵	9,544× 10 ⁵	9,371× 10 ⁵	6,850× 10 ⁴

7.2. Abbildungen im Anhang

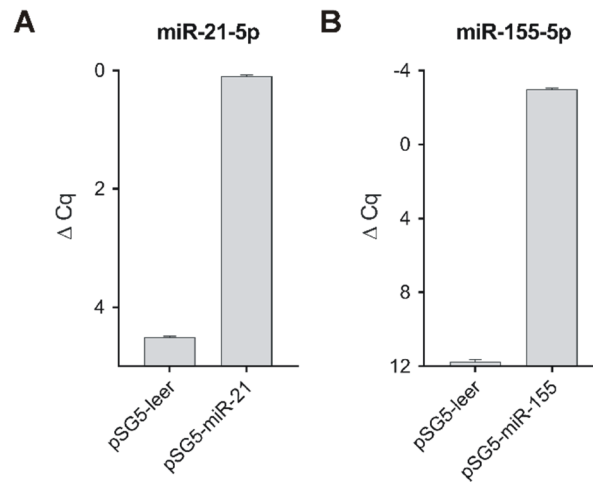


Abbildung A 1: Expressionskontrollen der pSG5-miR-21- und pSG5-miR-155-Effektorplasmide.

Die Überexpression der miR-21-5p sowie der miR-155-5p auf Grundlage der pSG5-miR-21- und pSG5-miR-155-Effektorplasmide wurde im Vergleich zu einer entsprechenden Negativkontrolle des leeren Effektorplasmides (pSG5-leer) mittels miRNA-spezifischer Taqman qRT-PCR nachgewiesen. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert und die zellulären RNA-Extrakte nach 48-stündiger Inkubation analysiert. Die Analyseresultate der jeweiligen cDNA-Probe (n=1 pro Bedingung) sind als Durchschnittsergebnis mit Angabe des Standardfehlers (SEM) einer dreifachen qPCR-Vermessung dargestellt.

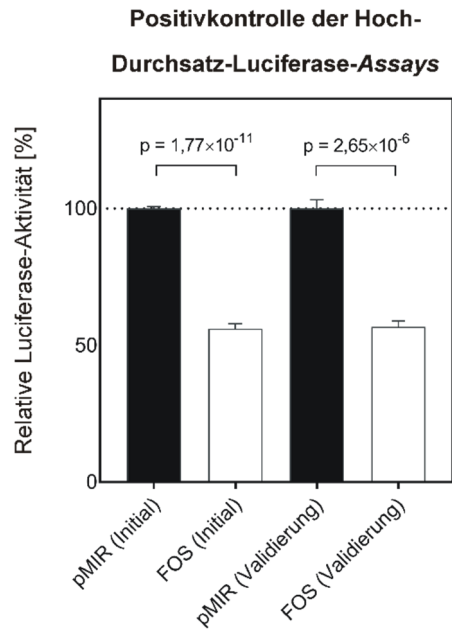


Abbildung A 2: Analyseergebnisse der mitgeführten Positivkontrolle im Rahmen der dualen Hoch-Durchsatz-Luciferase-Assays.

Im Rahmen der dualen Hoch-Durchsatz-Luciferase-Assays zur Identifizierung von miR-155-5p-Zielgenen wurde ein FOS-3'UTR-Konstrukt (pMIR-FOS-3'UTR) als Positivkontrolle mitgeführt. In Relation zum leeren Reporterplasmid (pMIR(-RNL-TK)) war sowohl bei den initialen Zielgen-Analysen als auch bei den Validierungs-Assays eine signifikante Reduktion der relativen Luciferase-Aktivität zu verzeichnen. Die relative Luciferase-Aktivität [%] ist als Mittelwert und mit Angabe des Standardfehlers (SEM) aus vier (initiale Analysen) bzw. drei (Validierung) unabhängigen Untersuchungen mit technischen Duplikaten dargestellt.

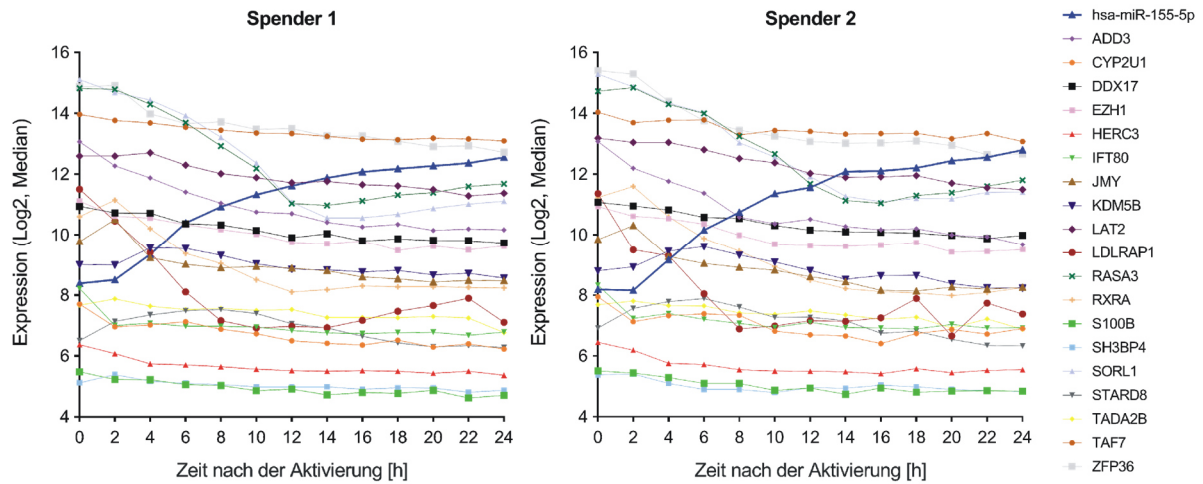


Abbildung A 3: Übersicht der zeitaufgelösten mRNA-Expressionsverläufe zu den mittels dualen Hoch-Durchsatz-Luciferase-Assays getesteten potenziellen miR-155-5p-Zielgenen.

Im Rahmen der dualen Hoch-Durchsatz-Luciferase-Assays wurden 19 potenzielle Zielgene der miR-155-5p getestet. Die zeitaufgelösten Expressionsdaten der zugehörigen mRNAs und der miR-155-5p sind für den 24 h Zeitverlauf der T-Zell-Aktivierung als Median aus der Analyse von jeweils drei separat aktivierten Zellproben pro Zeitpunkt und pro Spender dargestellt.

Kontrolle der Hintergrund-RNA

Unterschied [%] der korrigierten Rohsignalwerte:

Hintergrund-RNA (Eichung)
versus

0 h Zeitpunkt der Zeitverlaufsanalysen (Median)

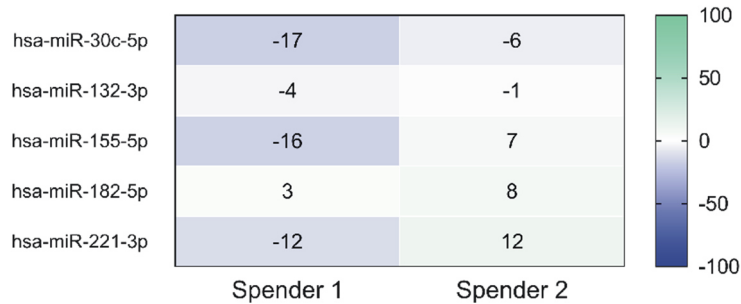


Abbildung A 4: Vergleich zwischen Hintergrund-RNA und 0 h Zeitpunkt der Zeitverlaufsanalysen.

Zur Kontrolle der Übertragbarkeit für die Quantifizierung der miRNA-Expressionsveränderungen in Relation zum zellulären Ruhezustand, wurde der prozentuale Unterschied in der Expression der quantifizierten miRNAs (Rohsignalwerte (Korrigiert)) zwischen der Hintergrund-RNA bei der Eichung (Inaktive T-Zell-Probe) und dem 0 h Zeitpunkt der Zeitverlaufsanalysen (Zeitpunkt vor Aktivierung der T-Zellen; Median von drei Replikaten pro Spender) bestimmt.

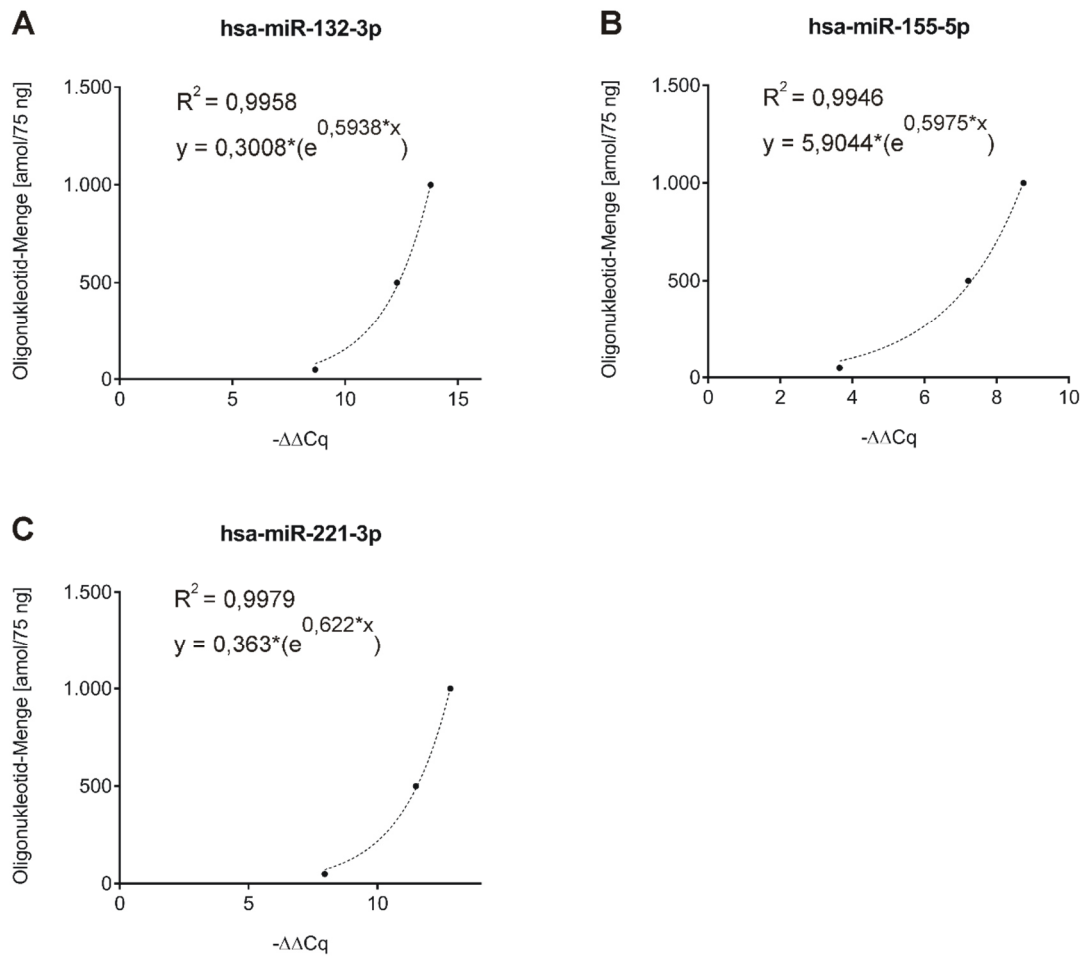


Abbildung A 5: Eichgeraden der quantitativen Taqman-Analysen.

Die dargestellten Eichkurven wurden durch Messungen von miRNA *spike-ins* vor dem RNA-Hintergrund einer inaktiven T-Zell-Probe (Ruhezustand) mithilfe des Taqman-Verfahrens ermittelt und beschreiben das Verhältnis zwischen den hinzugefügten Oligonucleotiden ([amol]; y-Achse) und den relativen Veränderungen in der Signalstärke ($-\Delta\Delta C_q$ -Werte; x-Achse).

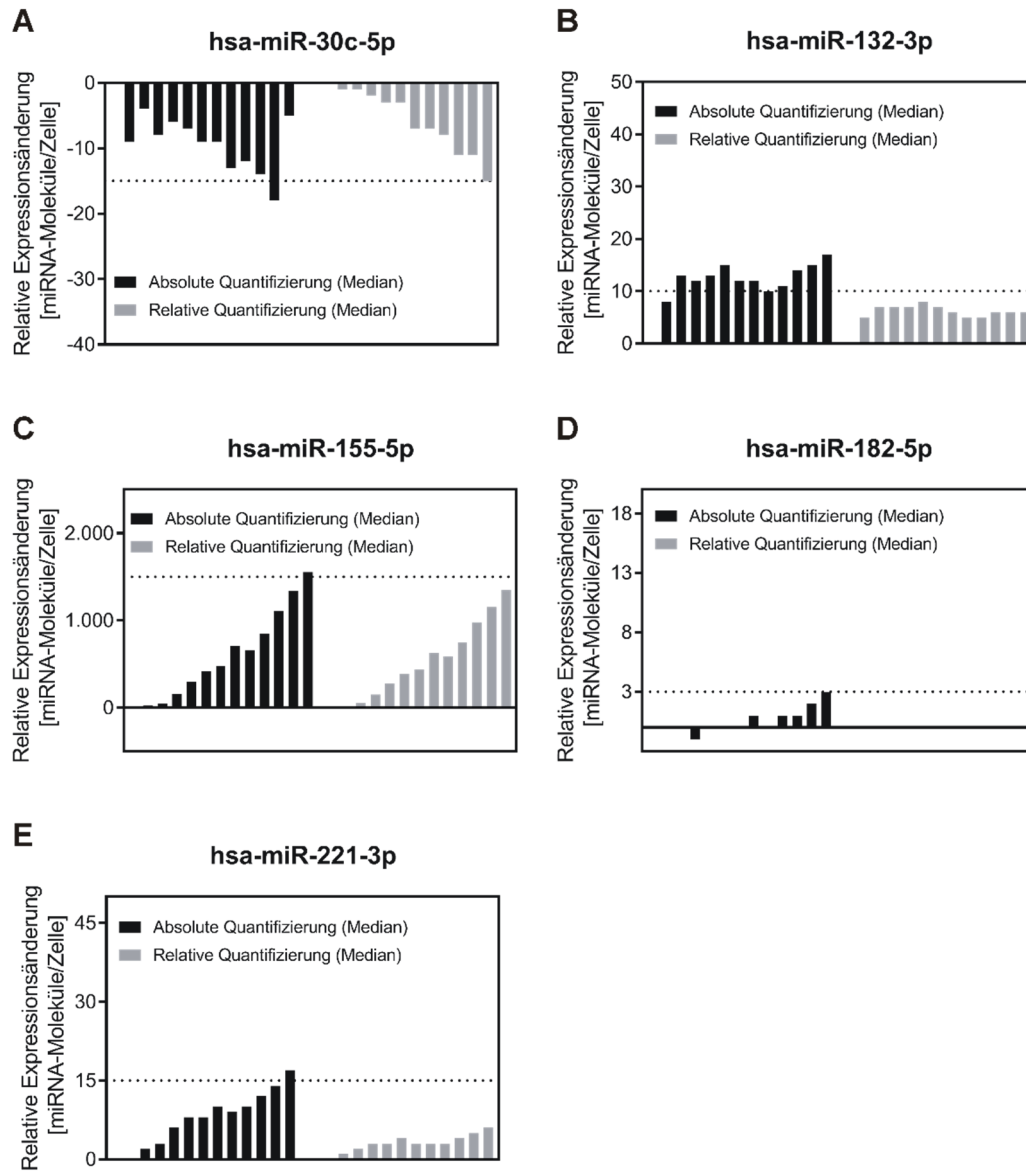


Abbildung A 6: Vergleichende Ergebnisse zur Quantifizierung der miRNA-Expressionsänderungen auf Grundlage der absoluten Eichkurve und der relativen Eichkurven.

Auf Grundlage der Microarray-Zeitverlaufsdaten und der durchschnittlichen Eichkurve, die zur Quantifizierung der absoluten Expression von allen detektierten miRNAs ermittelt wurde, wurden die relativen miRNA-Expressionsänderungen in Relation zum Ruhezustand (0 h) berechnet. Die relativen Zeitverlaufsmuster wurden anschließend mit den entsprechenden Resultaten von fünf miRNAs (A-E) verglichen, welche ebenfalls auf Basis von miRNA-spezifischen, relativen Eichkurven in Relation zum Ruhezustand (0 h) quantifiziert wurden. Die jeweiligen Quantifizierungsergebnisse sind als fortlaufende Zeitverlaufsbalken (2-24 h; Intervall: 2 h) und als Median Ergebnis für alle Analysen (n=6) pro Zeitpunkt dargestellt.

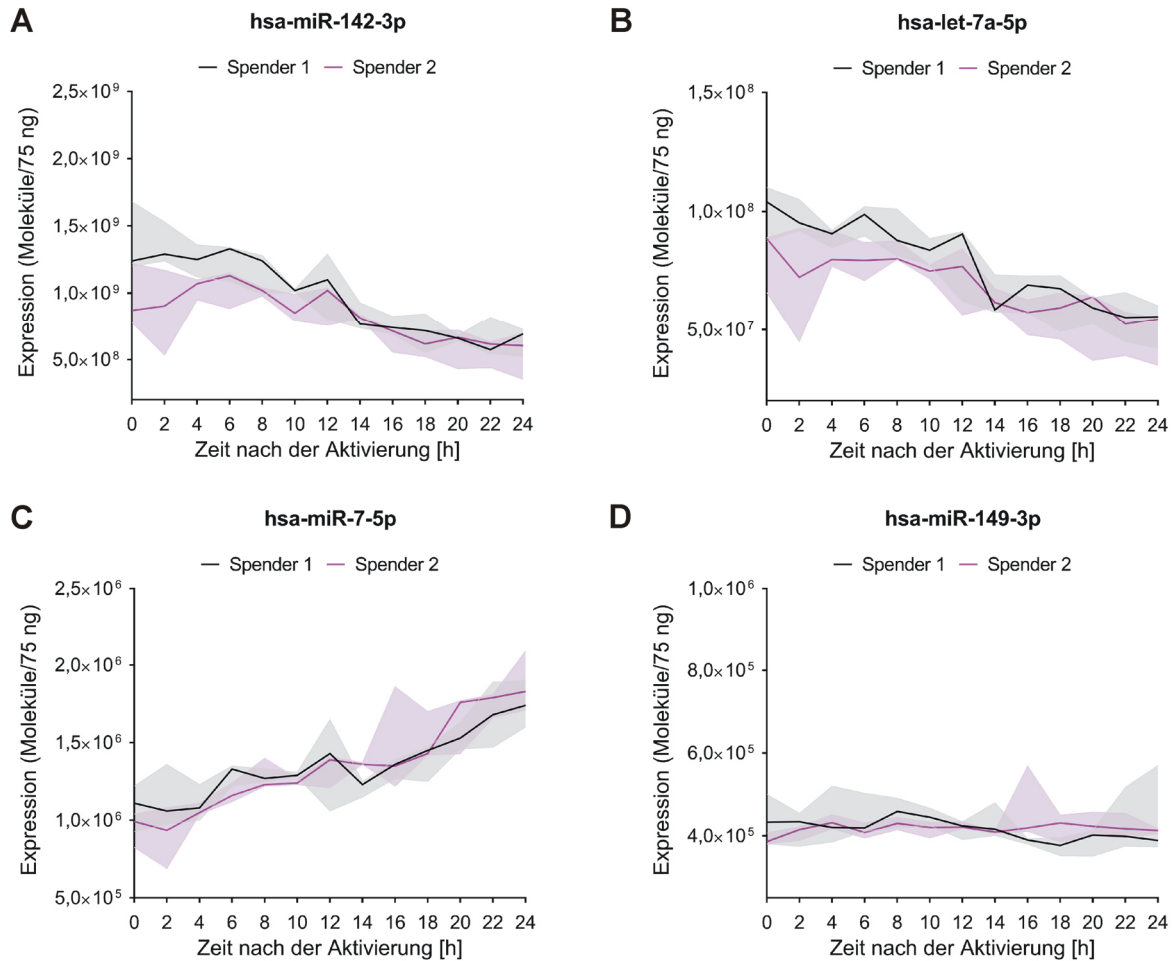


Abbildung A 7: Exemplarische Darstellung zur Veranschaulichung der allgemeinen Ähnlichkeit zwischen den quantitativen Daten der zeitaufgelösten miRNA-Expressionsanalysen.

Die Expressionsdaten sind auf Grundlage der Microarray basierten miRNA-Quantifizierung für exemplarische miRNAs mit sehr hoher (hsa-miR-142-3p), hoher (hsa-let-7a-5p), intermediärer (hsa-miR-7-5p) und geringer Expression (hsa-miR-149-3p) dargestellt, um die Reproduzierbarkeit der zugehörigen Zeitverlaufsmuster zu verdeutlichen. Die Expressionsverläufe sind dabei als Median-Ergebnis (Zeitverlaufslinie) mit dem Umfangsbereich der zugehörigen molekulare Expressionswerte (Farblich hinterlegt; bezogen auf 75 ng der analysierten Gesamt-RNA) auf Grundlage der Analyse von jeweils drei separat aktivierten Zellproben pro Zeitpunkt und pro Spender dargestellt.

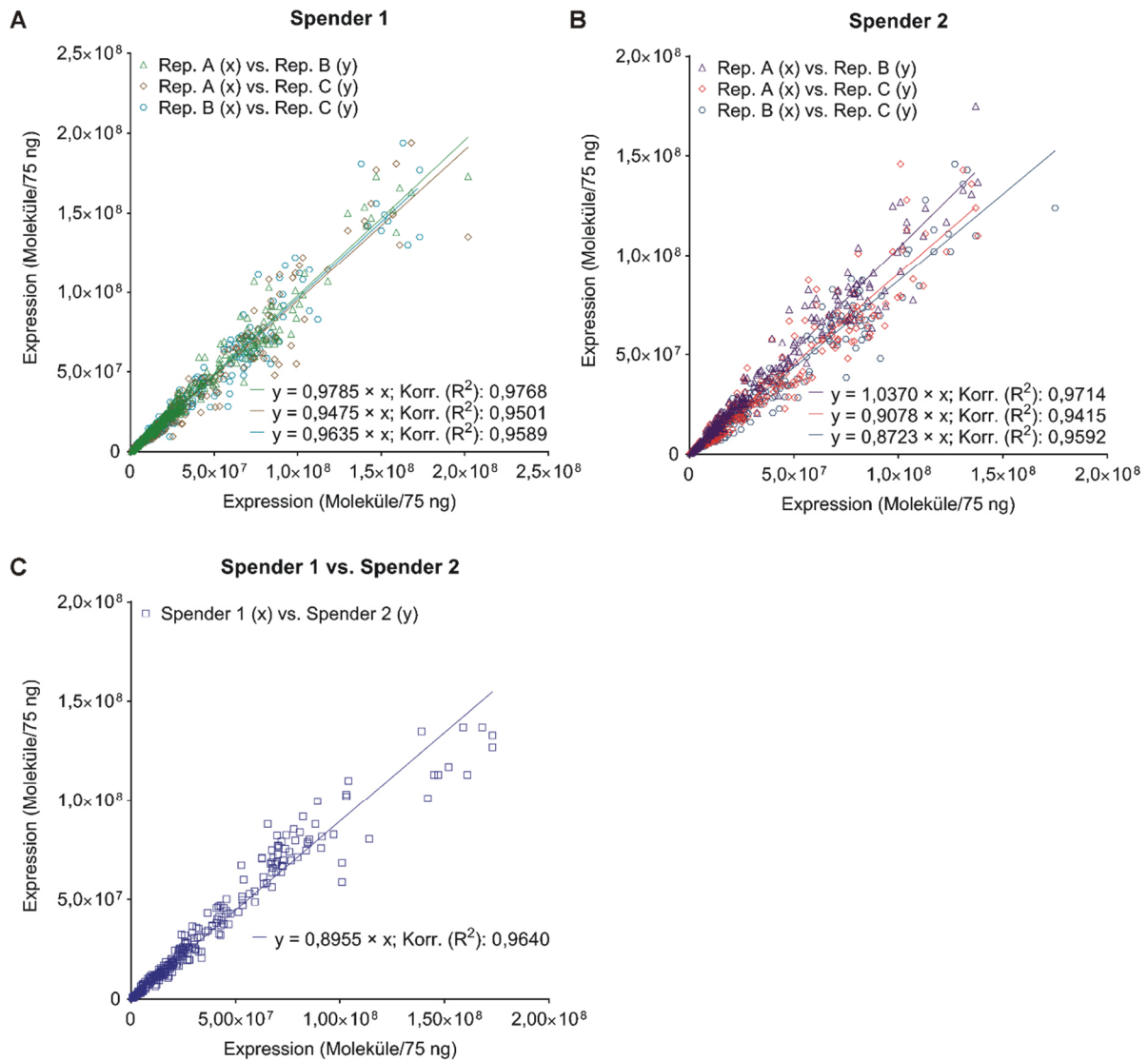


Abbildung A 8: Korrelation der quantifizierten, zeitaufgelösten miRNA-Expressionsdaten zwischen den technischen Replikaten und zwischen den unterschiedlichen Spendern.

- A, B:** Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit wurden die quantifizierten Expressionsdaten der miRNAs verglichen, welche auf Grundlage der log₂-Microarray-Daten in beiden Spendern signifikante und deutliche Expressionsveränderungen aufwiesen. Dazu wurden die Ergebnisse der Zeitverlaufsanalysen für jeden Spender zu jeweils drei kompletten Zeitverläufen (0-24 h) zusammengefasst, die in der Darstellung als technische Replikate (Rep.) A, B und C bezeichnet sind. Die Expressionsdaten der technischen Replikate wurden für jeden Spender (Spender 1 (**A**) und Spender 2 (**B**)) in paarweiser Gegenüberstellung korreliert. Die resultierenden Regressionslinien sind als Gesamtergebnis für den Vergleich aller miRNAs (n=39) und aller Analysezeitpunkte (n=13), mit Angabe der zugehörigen Geradengleichung sowie des Korrelationskoeffizienten (Korr.; Bestimmtheitsmaß, R^2) impliziert.
- C:** Für den Abgleich zwischen den Spendern wurden die quantifizierten Expressionsdaten auf das jeweilige Median-Ergebnis der technischen Replikate reduziert (vergleiche Beschreibung (**A**, **B**)). Die zugehörige Regressionslinie ist als Gesamtergebnis für den Vergleich aller miRNAs (n=39) und aller Analysezeitpunkte (n=13), mit Angabe der Geradengleichung sowie des Korrelationskoeffizienten (Korr.; Bestimmtheitsmaß, R^2) impliziert.

8. Publikationsliste

* Diese Autoren trugen als Erstautoren gleichermaßen zur Publikation bei.

Diese Autoren trugen als Senior-Autoren gleichermaßen zur Publikation bei.

Im Rahmen meiner Promotion am Institut für Humangenetik (Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes) unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese sind folgende Veröffentlichungen entstanden (chronologisch aufgelistet):

Keller A, Fehlmann T, Ludwig N, Kahraman M, Laufer T, Backes C, Vogelmeier C, **Diener C**, Biertz F, Herr C, Jorres RA, Lenhof HP, Meese E#, Bals R#, Group CS (2018) Genome-wide MicroRNA Expression Profiles in COPD: Early Predictors for Cancer Development. Genomics Proteomics Bioinformatics 16:162-171

Diener C*, Hart M*, Alansary D, Poth V, Walch-Ruckheim B, Menegatti J, Grasser F, Fehlmann T, Rheinheimer S, Niemeyer BA, Lenhof HP, Keller A, Meese E (2018) Modulation of intracellular calcium signaling by microRNA-34a-5p. Cell Death Dis 9:1008

Diener C, Galata V, Keller A#, Meese E# (2019) MicroRNA profiling from dried blood samples. Crit Rev Clin Lab Sci 56:111-117

Keller A, Ludwig N, Fehlmann T, Kahraman M, Backes C, Kern F, Vogelmeier CF, **Diener C**, Fischer U, Biertz F, Herr C, Jorres RA, Lenhof HP, Bals R, Meese E (2019) Low miR-150-5p and miR-320b Expression Predicts Reduced Survival of COPD Patients. Cells 8

Fehlmann T*, Kahraman M*, Ludwig N, Backes C, Galata V, Keller V, Geffers L, Mercaldo N, Hornung D, Weis T, Kayvanpour E, Abu-Halima M, Deuschle C, Schulte C, Suenkel U, von Thaler AK, Maetzler W, Herr C, Fahndrich S, Vogelmeier C, Guimaraes P, Hecksteden A, Meyer T, Metzger F, **Diener C**, Deutscher S, Abdul-Khaliq H, Stehle I, Haeusler S, Meiser A, Groesdonk HV, Volk T, Lenhof HP, Katus H, Balling R, Meder B, Kruger R, Huwer H, Bals R, Meese E, Keller A (2020) Evaluating the Use of Circulating MicroRNA Profiles for Lung Cancer Detection in Symptomatic Patients. JAMA Oncol 6:714-723

Gerstner N*, Kehl T*, Lenhof K, Muller A, Mayer C, Eckhart L, Grammes NL, **Diener C**, Hart M, Hahn O, Walter J, Wyss-Coray T, Meese E, Keller A, Lenhof HP (2020) GeneTrail 3: advanced high-throughput enrichment analysis. Nucleic Acids Res 48:W515-W520

Krammes L*, Hart M*, Rheinheimer S, **Diener C**, Menegatti J, Grasser F, Keller A, Meese E (2020) Induction of the Endoplasmic-Reticulum-Stress Response: MicroRNA-34a Targeting of the IRE1alpha-Branch. *Cells* 9

Diener C*, Hart M*, Kehl T, Rheinheimer S, Ludwig N, Krammes L, Pawusch S, Lenhof K, Tanzer T, Schub D, Sester M, Walch-Ruckheim B, Keller A, Lenhof HP, Meese E (2020) Quantitative and time-resolved miRNA pattern of early human T cell activation. *Nucleic Acids Res* 48:10164-10183

Hart M*, Nickl L*, Walch-Rueckheim B, Krammes L, Rheinheimer S, **Diener C**, Taenzer T, Kehl T, Sester M, Lenhof HP, Keller A, Meese E (2020) Wrinkle in the plan: miR-34a-5p impacts chemokine signaling by modulating CXCL10/CXCL11/CXCR3-axis in CD4(+), CD8(+) T cells, and M1 macrophages. *J Immunother Cancer* 8

Kern F*, Krammes L*, Danz K, **Diener C**, Kehl T, Kuchler O, Fehlmann T, Kahraman M, Rheinheimer S, Aparicio-Puerta E, Wagner S, Ludwig N, Backes C, Lenhof HP, von Briesen H, Hart M#, Keller A#, Meese E# (2021) Validation of human microRNA target pathways enables evaluation of target prediction tools. *Nucleic Acids Res* 49:127-144

9. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt dem Leiter des Instituts für Humangenetik, Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese. Vielen Dank, dass ich meine Promotion auf diesem interessanten und vielseitigen Forschungsfeld durchführen durfte, für die vielen hilfreichen Anregungen, die konstruktiven Gespräche, die Förderung meiner Ideen und das Vertrauen in meine Arbeit. Danke für die großartige Unterstützung als Chef und Doktorvater und für die Möglichkeit während meiner Promotionzeit wissenschaftliche Expertise bei einer Vielzahl an interessanten Forschungsprojekten sammeln zu dürfen.

Ich bedanke mich vielmals bei unseren zahlreichen Kooperationspartnern für die wertvolle Zusammenarbeit im Rahmen meines Dissertationsprojektes, aber auch bei vielen weiteren interdisziplinären Studien.

Einen besonderen Dank möchte ich an die Arbeitsgruppe von Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hans-Peter Lenhof des Zentrums für Bioinformatik (Universität des Saarlandes), insbesondere an Herrn Tim Kehl und Frau Kerstin Lenhof, für die vielfältige und beständige Unterstützung im Rahmen der bioinformatischen Auswertungen richten.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Andreas Keller und seinem Team des Lehrstuhls für Klinische Bioinformatik (Universität des Saarlandes) für die zuverlässige und erfolgreiche Zusammenarbeit bei vielen gemeinsamen Forschungsprojekten.

Vielen Dank an Frau PD Dr. rer. nat. Barbara Walch-Rückheim und Frau Tanja Tänzer aus der Nachwuchsgruppe Virologie/Immunologie (Zentrum für Human- und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) für die Hilfsbereitschaft, Unterstützung und tolle Zusammenarbeit im Rahmen der T-Zell-Experimente.

Danke auch an Herrn Prof. em. Dr. rer. nat. Friedrich Grässer vom Institut für Virologie (Universitätsklinikum des Saarlandes) für die Zurverfügungstellung des pMIR-RNL-TK- sowie der pSG5-miR-21 und pSG5-miR-155-5p-Plasmide.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. David Schub aus der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester der Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie (Universität des Saarlandes) für die Weiterleitung der Blutproben sowie bei dem Zentrallabor der Universitätsklinik des Saarlandes für die anschließende Durchführung der Blutbild-Analysen bedanken.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Beteiligten des HISENTS („High level Integrated SEnsor for NanoToxicity Screening“)-Projektes (EU, H2020), an dem ich mich während meiner Promotionszeit am Institut für Humangenetik beteiligen durfte und so erste Erfahrungen in Bezug auf internationale wissenschaftliche Kooperationen sammeln konnte.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die gegenseitige Unterstützung und das angenehme Arbeitsumfeld.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Martin Hart bedanken, der mir bereits seit meiner Master-Arbeit am Institut für Humangenetik stets mit seiner Gesprächsbereitschaft, mit vielen hilfreichen Ratschlägen und seiner umfassenden wissenschaftlichen Expertise zur Seite stand. Vielen Dank für die großartige und langjährige gemeinsame Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Frau Dr. rer. nat. Nicole Ludwig richten. Vielen Dank für die vielen hilfreichen Tipps zu den RNA-basierten Untersuchungen, die produktive und angenehme Zusammenarbeit im Rahmen des HISENTS-Projektes sowie bei vielen weiteren gemeinsamen Forschungsprojekten.

Des Weiteren danke ich Frau Stefanie Rheinheimer, die mich bei den verschiedensten Fragen des Laboralltags mit ihrer Hilfsbereitschaft und ihrem vielseitigen wissenschaftlichen Fachwissen unterstützt hat.

Danke an meine Büro- beziehungsweise Doktoranden-Kollegen*innen, Lena Krammes, Giuseppe Rigogliuso, Laura Gröger und Laura Nickl, für die tolle Gemeinschaft, den gegenseitigen Rückhalt und die schöne gemeinsame Zeit.

Mein weiterer Dank geht an Frau Laura Nickl für die Durchführung der Blutentnahme als Vorbereitung für die T-Zell-Analysen sowie an Frau Sarah Pawusch, die mich im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit am Institut für Humangenetik bei einigen der Klonierungsarbeiten unterstützt hat.

Weiterhin vielen Dank an Frau Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Fischer für die große Gesprächs- und Hilfsbereitschaft bei den verschiedensten wissenschaftlichen Fragestellungen.

Natürlich möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre immerwährende Unterstützung bedanken. Mein größter Dank gilt dabei meinen Eltern und meiner Schwester, die dazu beigetragen haben, dass in mir schon früh das Interesse für die Natur und die Naturwissenschaft geweckt wurde, die immer für mich da waren, mich auch in stressigen Situationen aufgebaut und motiviert haben, die mich stets bestärkt und immer an mich geglaubt haben.

10. Lebenslauf

[Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.]

