

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

Regulation der CXC-Familie durch die miR-34a-5p

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2021

vorgelegt von
Laura Marie Nickl
geb. am: 02.02.1995
in Schwäbisch Gmünd

Tag der Promotion: 21. Juni 2022

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

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese

Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Boehm

„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker;
er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.“

Marie Curie

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	II
II. Abkürzungsverzeichnis.....	VI
III. Abbildungsverzeichnis.....	XII
IV. Tabellenverzeichnis.....	XIV
1 Zusammenfassung	1
2 Summary.....	2
3 Einleitung.....	3
3.1 RNA-Interferenz (RNAi)	3
3.2 miRNAs.....	3
3.2.1 Biogenese kanonischer miRNAs	4
3.2.2 Bedeutung der miRNAs.....	7
3.3 miR-34a-5p	7
3.4 miR-34a-5p und das Immunsystem	9
3.5 Das Immunsystem	10
3.6 Chemokine.....	11
3.7 Die CXC-Chemokinfamilie	11
3.8 Zielsetzung.....	12
4 Material	13
4.1 Geräte	13
4.2 Gerätezubehör	15
4.3 Verbrauchsmaterialien	16
4.4 Reaktionskits.....	16

4.5 Chemikalien	17
4.6 Puffer und Lösungen.....	19
4.7 Größenmarker.....	20
4.8 Enzyme	21
4.9 Antikörper.....	21
4.9.1 Western-Blot-Antikörper	21
4.9.2 Durchflusszytometrie-Antikörper.....	22
4.9.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA)-Antikörper	22
4.10 Oligonukleotide	23
4.10.1 Klonierungsprimer	23
4.10.2 pMIR-RNL-TK-Primer.....	24
4.10.3 Mutageneseprimer	25
4.10.4 Synthetische miRNAs und Kontrollen.....	25
4.11 Plasmide	26
4.11.1 pGEM.....	26
4.11.2 pSG5.....	27
4.11.3 pSG5-miR-34a-5p.....	27
4.11.4 pMIR-RNL-TK	28
4.11.5 Reporterplasmide.....	29
4.11.6 Mutierte Reporterplasmide	30
4.12 Bakterienstämme, eukaryotische Zelllinien, humane primäre Zellen	30
4.12.1 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	30
4.12.2 HEK293T	30
4.12.3 Primäre Zellen.....	30
4.13 Nährmedien für Bakterien und Zellen.....	30
4.13.1 Bakterielle Nährmedien.....	30
4.13.2 Zellkulturmedien.....	31
4.14 Computerprogramme	32
4.15 Websites	33
5 Methoden	34
5.1 DNA-Techniken.....	34
5.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34

5.1.2	Selektion korrekt klonierter Plasmide mittels Kolonie-PCR	36
5.1.3	Mutagenese der Zielsequenz	37
5.1.4	Agarosegelelektrophorese.....	38
5.1.5	DNA-Aufreinigung mit NucleoSpin.....	39
5.1.6	Enzymatische Modifikation der DNA	39
5.1.7	Konzentrationsmessung mittels Spektralphotometer	41
5.2	prokaryotische Zellkultur	42
5.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	42
5.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> (Stamm NEB®5-alpha).....	42
5.2.3	Ligation über pGEM®T-Easy und Blau-Weiß-Selektion.....	43
5.2.4	Plasmidaufreinigung durch NucleoBond.....	44
5.3	eukaryotische Zellkultur	44
5.3.1	HEK293T	44
5.3.2	Primäre Zellen.....	45
5.3.3	Zellzahlbestimmung mit dem LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter	48
5.3.4	Transfektionstechniken	48
5.3.5	Durchflusszytometrie.....	49
5.4	Dual-Luciferase-Reporter-Assay	54
5.5	RNA-Techniken.....	56
5.5.1	RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen.....	56
5.5.2	Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA-Banken für cDNA und qPCRs zum Nachweis von miRNAs	57
5.5.1	Quantitative Echtzeit-PCR (<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i> , qPCR)	59
5.5.2	Genexpressionsanalyse mittels Microarray	62
5.5.3	Qualitätsbestimmung von RNA mittels Bioanalyzer	66
5.6	Proteintechniken	67
5.6.1	Isolation von Proteinextrakten aus CD4 ⁺ -T-Zellen	67
5.6.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	68
5.6.3	Western Blot	68
5.6.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	70
6	Ergebnisse.....	72
6.1	Genexpressionsanalyse mittels Microarray.....	72
6.2	Dual-Luciferase-Reporter-Assays	76

6.2.1	Negativ getestete Zielgene.....	79
6.2.2	Positiv getestete Zielgene	82
6.3	Quantitative Chemokinexpressionsanalysen	88
6.3.1	Quantitative Analyse der CXCR3-Expression von CD4 ⁺ -T-Zellen bei miR-34a-5p-Überexpression	88
6.3.2	Quantitative Analyse der CXCL10- und CXCL11-Expression von M1-Makrophagen bei miR-34a-5p-Überexpression	91
7	Diskussion.....	93
7.1	Genexpressionsanalyse von miR-34a-5p überexprimierenden M1-Makrophagen mittels Microarray.....	93
7.2	Zielgenidentifizierung der miR-34a-5p durch Dual-Luciferase-Assays.....	94
7.3	Quantitative Analyse der CXCR3-Expression von CD4 ⁺ -T-Zellen bei miR-34a-5p-Überexpression	95
7.4	Quantitative Analyse der CXCL10- und CXCL11-Expression von M1-Makrophagen bei miR-34a-5p-Überexpression	95
7.5	Regulation der CXCL10/CXCL11/CXCR3-Achse durch die miR-34a-5p	96
7.5.1	Regulation der Chemotaxis durch die miR-34a-5p- abhängige CXCL10/CXCL11/CXCR3-Achse.....	97
7.5.2	Regulation der CD4 ⁺ Zell-Differenzierung durch die miR-34a-5p- abhängige CXCL10/CXCL11/CXCR3-Achse.....	98
7.5.3	Die miR34a-5p, die CXCL10/CXCL11/CXCR3 Achse und Krebs	99
7.6	Die miR-34a-5p in der Tumorthherapie.....	100
8	Literaturverzeichnis.....	101
9	Anhang.....	116
9.1	CXCL16-Mutante	116
9.2	Durchflusszytometrie: Gating und Isotypenkontrolle	117
9.3	Transfektionskontrolle mittels qPCR	117
10	Publikation.....	119
11	Dank	120
12	Lebenslauf	121

II. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
A	Adenin
AGO	Argonautenproteine
ANC	<i>all negative control</i>
APC-(A)	Allophycocyanin A
APZ-	antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Becton, Dickinson and Company
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _q	<i>quantification cycle</i> , Quantifizierungszyklus
cRNA	<i>complementary ribonucleic acid</i> , komplementäre Ribonukleinsäure
CST	Cell Signaling Technology, Incorporated (Inc.)
C _t	<i>threshold cycle</i> , Schwellenwertzyklus
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
CTP	Cytosintriphosphat
CXCL	CXC-Ligand

Abkürzungsverzeichnis

CXCR	CXC-Rezeptor
Cyanin 3 pCp	Cytidin-5'-phosphat-3'-(6-aminohexyl)phosphat markiert mit Cyanin 3
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	DL-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Elektrochemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
FU	Fluoreszenzunits
g	Gramm
G	Guanin

Abkürzungsverzeichnis

GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GO	<i>gene ontology</i>
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEK-Zelle	<i>human embryonic kidney cell</i> , menschliche embryonale Nierenzelle
Hsc70	Heat shock cognate 70
Hsp90	heat shock protein 90
IFN	Interferon
IFN-β	Interferon beta
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
Inc.	<i>incorporated</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaar
l	Liter
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
LPS	Lipopolysaccharides
MCS-	<i>multiple cloning site</i>
m	Milli-
Mg ²⁺	Magnesiumion
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
miR, miRNA, microRNA	<i>micro ribonucleic acid</i> , Mikroribonukleinsäure
miRTC	<i>microRNA reverse transcription control</i>
ml	Milliliter
mRNA.	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

mut	mutiert
mW	Milliwatt
N	Stickstoff
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center für Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
n	Nano-
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	<i>non small cell lung cancer</i> , nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
NT	Nukleotid
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OE-PCR	<i>overlap extension polymerase chain reaction</i>
p	Pico-
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH-Wert	<i>potentia hydrogenii</i> -Wert
piRNA	<i>piwi-interacting ribonucleic acid</i>
PLB	Passive Lysis Buffer
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POL II	RNA-Polymerase II
Poly(A)-Schwanz	Poly-Adenosin-Schwanz
pre-miRNA	<i>precursor micro ribonucleic acid</i> , Vorläufer-miRNA
pri-miRNA	<i>primary micro ribonucleic acid</i> , primäre miRNA
PVC	Polyvinylchlorid
p-Wert	<i>probabilitas</i> -Wert, Überschreitungswahrscheinlichkeit
qPCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-PCR

Abkürzungsverzeichnis

RAN-GTP	<i>ras-related nuclear protein guanosintriphosphate</i>
RAP	rAPid Alkaline Phosphatase
RIN	<i>ribonucleic acid integrity number</i>
RISC	<i>ribonucleic acid-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI-Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SB-Puffer	<i>sample buffer</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>small hairpin ribonucleic acid</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
snoRNA	<i>small nucleolar ribonucleic acid</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SV 40	<i>simian virus 40</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween®</i>
TCRA	<i>T-cell receptor alpha locus</i> , α -Kette des T-Zell-Rezeptors
T _H 1/2/17	Typ 1/2/17-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TNRC6	<i>trinucleotide repeat containing gene 6 protein</i>
TNRC6	(Tumor)-Protein 53

Abkürzungsverzeichnis

TRBP	<i>human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein</i>
Tr, T _{reg}	regulatorische T-Zelle
U	<i>units</i> , Maß für Enzymmenge
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
v-	Volumen
w	<i>weight</i> , Gewicht
wt	Wildtyp

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biogenese und Funktion kanonischer miRNAs.	6
Abbildung 2: Effekte der miR-34a-5p auf die Karzinogenese.....	8
Abbildung 3: Vektorkarte des pGEM®-T Easy (Promega Corporation).....	26
Abbildung 4: Vektorkarte des pSG5-Expressionsplasmids (Agilent Technologies, Stratagene).	27
Abbildung 5: Vektorkarte des pMIR-RNL-TK.	28
Abbildung 6: OE-PCR.....	37
Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.....	52
Abbildung 8: Durchflusszytometrie.	53
Abbildung 9: Graphische Auswertung eines Bioanalyzer-Nanochips.	67
Abbildung 10: Ergebnisse der over-Representation-Analyse.	75
Abbildung 11: Ergebnisse der Protein-Netzwerk-Analyse.	76
Abbildung 12: Herangehensweise bei der Selektion der CXC-Chemokinfamilie zur Untersuchung auf Zielgene der miR-34a-5p.	77
Abbildung 13: Grafische Darstellung der klonierten pMIR-RNL-TK CXCR1- (A) und CXCR2- (B) 3'UTR-Reportergergenkonstrukte und Ergebnissen der Dual-Luciferase-Reporter-Assays.....	80
Abbildung 14: Grafische Darstellung der klonierten pMIR-RNL-TK CXCL2- (A), CXCL5-(B) und CXCL12- (C) 3'UTR-Reportergergenkonstrukte und der Ergebnisse der Dual-Luciferase-Reporter-Assays.....	81
Abbildung 15: Grafische Darstellung des klonierten pMIR-RNL-TK CXCR3- (A) 3'UTR- Reportergergenkonstrukts und der Ergebnisse des Dual-Luciferase-Reporter-Assays.....	83
Abbildung 16: Grafische Darstellung des klonierten pMIR-RNL-TK CXCL1- (A) 3'UTR- Reportergergenkonstrukts und der Ergebnisse des Dual-Luciferase-Reporter-Assays.....	84
Abbildung 17: Grafische Darstellung der klonierten pMIR-RNL-TK CXCL10- (A) und CXCL11- (B) 3'UTR-Reportergergenkonstrukte und der Ergebnisse der Dual-Luciferase- Reporter-Assays.....	85
Abbildung 18: Grafische Darstellung des klonierten pMIR-RNL-TK CXCL14- (A) 3'UTR- Reportergergenkonstrukts und der Ergebnisse des Dual-Luciferase-Reporter-Assays.....	86

Abbildung 19: Grafische Darstellung des klonierten pMIR-RNL-TK CXCL16- (A) 3'UTR-Reportergenkonstrukts und der Ergebnisse des Dual-Luciferase-Reporter-Assays.....	87
Abbildung 20: Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....	89
Abbildung 21: Exemplarische Darstellung und Ergebnisse der Western Blots.....	90
Abbildung 22: Ergebnisse der ELISAs.	92
Abbildung 23: Effekt der miR-34a-5p auf die Chemotaxis der T-Zellen.....	98
Abbildung 24: Das CXCL16 mut Oligonukleotid in 5' →3' Richtung.....	116
Abbildung 25: (A) Gating, (B, C) Isotypenkontrolle.....	117
Abbildung 26: Transfektionskontrolle mittels qPCR.	118

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte.	13
Tabelle 2: Auflistung des verwendeten Gerätezubehörs.	15
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	16
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Reaktionskits.	16
Tabelle 5: Auflistung aller eingesetzten Chemikalien.	17
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen.	19
Tabelle 7: Auflistung der eingesetzten Enzyme.	21
Tabelle 8: Auflistung der eingesetzten Western Blot-Antikörper.	21
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Durchflusszytometrie-Antikörper.	22
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten ELISA-Antikörper.	22
Tabelle 11: Auflistung aller Forward-Primer mit Restriktionsschnittstellen sowie den jeweils eingesetzten Restriktionsendonukleasen zur Klonierung der jeweiligen Zielgene. ...	23
Tabelle 12: Auflistung aller Reverse-Primer mit Restriktionsschnittstellen sowie den jeweils eingesetzten Restriktionsendonukleasen zur Klonierung der jeweiligen Zielgene. ...	24
Tabelle 13: Sequenzen der pMIR-Oligonukleotidprimer.	24
Tabelle 14: Nukleotidsequenzen der eingesetzten Mutageneseprimer.	25
Tabelle 15: Liste aller in dieser Arbeit klonierten Wildtyp-pMIR-RNL-TK-Plasmide mit jeweiliger Zielgen-3'UTR, der als Vorlage verwendeten Matrizen-Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit National Center for Biotechnology Information(NCBI)-Referenznummer, der Größe des Inserts, sowie Art und Anzahl der vorhergesagten miR-34a-5p-Bindestellen.	29
Tabelle 16: Eingesetzte bakterielle Nährmedien.	31
Tabelle 17: Eingesetzte Zellkulturmedien.	31
Tabelle 18: Eingesetzte Computerprogramme.	32
Tabelle 19: Eingesetzte Websites.	33
Tabelle 20: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.	34
Tabelle 21: Thermocyclerprogramm zur Durchführung einer PCR.	35
Tabelle 22: Thermocyclerprogramm zur Durchführung einer Kolonie-PCR.	36
Tabelle 23: Standard-Restriktionsverdau.	40

Tabelle 24: Zusammensetzung eines pMIR-Restriktionsverdau.....	40
Tabelle 25: Standard-Ligationsansatz.....	41
Tabelle 26: Zusammensetzung eines pGEM-Ligationsansatzes.....	43
Tabelle 27: Transfektionsschema für HEK293T-Zellen.....	55
Tabelle 28: Zusammensetzung eines Omniscript RT Kit Ansatzes zur Umschreibung von mRNA in cDNA.....	58
Tabelle 29: Zusammensetzung eines miScript II RT Kit-Reaktionsansatzes für die reverse Transkription kleiner RNAs zur Durchführung von qPCRs.....	59
Tabelle 30: Zusammensetzung eines qPCR-Mastermix, einfache Menge.....	60
Tabelle 31: Voreingestelltes qPCR-Cycler-Programm.....	61
Tabelle 32: Ansatz zur Vorbereitung der RNA für die reverse Transkription.....	63
Tabelle 33: Zusammensetzung des cDNA-Mastermix, ausreichend für 10 Ansätze.....	63
Tabelle 34: Zusammensetzung des Transkriptionsmastermix, die hier aufgeführten Mengenangaben sind für 10 Ansätze ausreichend.....	64
Tabelle 35: Auflistung der für den Microarray Fragmentation Mix benötigten Substanzen sowie der eingesetzten Mengen.....	64
Tabelle 36: Die 20 mRNAs mit dem größten positiven bzw. negativen fold change.....	72

1 Zusammenfassung

Chemokine sind eine Untergruppe der Zytokine, die von Immunzellen sezerniert werden, Chemotaxis vermitteln und an der Regulation der Angiogenese beteiligt sind (STRIETER et al., 1995; ZLOTNIK, YOSHIE, 2000). Die microRNA-34a-5p (miRNA/miR) ist eine bekannte Tumorsuppressor-microRNA, deren Expression in vielen Tumoren erniedrigt und in mehreren Immunzellsubsets von Lungenkrebskranken gegenüber Gesunden erhöht ist (FUJITA et al., 2008; GALLARDO et al., 2009; HART et al., 2016; LEIDINGER et al., 2014; TAZAWA et al., 2007).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der miR-34a-5p auf chemokinvermittelte Signalwege in Immunzellen zu untersuchen. Mittels Microarray von miR-34a-5p transfizierten M1-Makrophagen wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dabei konnten unter den reprimierten Genen die Chemokine *CXCL10* und *CXCL11* identifiziert werden. Durch bioinformatische Zielgenvorhersagen für die miR-34a-5p in Kombination mit Signalweganalysen konnten auch in *in silico*-Analysen die CXC-Chemokinfamilie und deren Rezeptoren als potenzielle Zielgene identifiziert werden. Die Verifikation durch Dual-Luciferase-Assays ergab, dass *CXCL1*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL14*, *CXCL16* sowie *CXCR3* über posttranskriptionelle Repression durch die miR-34a-5p reguliert werden. Durch Western Blots und durchflusszytometrische Analysen konnte die Reduktion von CXCR3 durch miR-34a-5p-Überexpression auf Protein-niveau in CD4⁺-T-Zellen bestätigt werden. Mit Hilfe von Enzyme-linked Immunosorbent Assays konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der miR-34a-5p in M1-Makrophagen eine verringerte CXCL10- und CXCL11-Sekretion zur Folge hat. Die Überexpression der miR-34a-5p in den verschiedenen Immunzellsubsets könnte daher durch eine geringere CXCR3-Expression auf CD4⁺-T-Zellen zu einer verringerten Differenzierung in T_H1-Zellen führen und auf diesem Weg die T_H1-vermittelte Immunantwort einschränken. Eine reduzierte CXCL10- und CXCL11-Sekretion führt zu einer geringeren Chemotaxis von T-Zellen, die wie M1-Makrophagen eine Antitumorwirkung ausüben (GENG et al., 2015; OHRI et al., 2009; WELSH et al., 2005; ZHENG et al., 2020). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen daher den Schluss nahe, dass die Überexpression der miR-34a-5p in Immunzellen von Tumorpatienten einen Einfluss auf die Antitumorantwort hat.

2 Summary

Chemokines are a subset of cytokines, which mediate chemotaxis and are involved in the regulation of angiogenesis. The microRNA-34a-5p (miRNA/miR) is a well-known tumor suppressor microRNA, whose expression is reduced in many tumors and increased in numerous immune cell subsets of lung cancer patients compared to healthy individuals.

The aim of this work was to investigate the influence of miR-34a-5p on chemokine-mediated signaling pathways in immune cells. A gene expression analysis was carried out using a microarray of M1 macrophages transfected with miR-34a-5p. Among the repressed genes, the chemokines *CXCL10* and *CXCL11* could be identified. Bioinformatic target gene predictions for miR-34a-5p in combination with pathway analysis identified the CXC chemokine family and their receptors as potential target genes in *in silico* analysis. Performing Dual-Luciferase assays, it could be verified that *CXCL1*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL14*, *CXCL16* and *CXCR3* are regulated by miR-34a-5p via post-transcriptional repression. The miR-34a-5p induced reduction of CXCR3 in CD4⁺ T cells could be confirmed at protein level by western blots and flow cytometry. Enzyme-linked immunosorbent assays showed that overexpression of miR-34a-5p in M1 macrophages results in a reduced secretion of CXCL10 and CXCL11. High levels of miR-34a-5p in various immune cell subsets could therefore cause a reduced differentiation of CD4⁺ T cells into T_H1 cells due to lower CXCR3 expression, leading to a reduced T_H1-mediated immune response. A lower secretion of CXCL10 and CXCL11 hampers the chemotaxis of T cells, which, like M1 macrophages, exert an anti-tumor effect (GENG et al., 2015; OHRI et al., 2009; WELSH et al., 2005; ZHENG et al., 2020). Taken together, the results of this work suggest that overexpression of miR-34a-5p in immune cells of tumor patients influences the anti-tumor response.

3 Einleitung

3.1 RNA-Interferenz (RNAi)

Bereits zu Beginn der 1990iger Jahre zeichnete sich ab, dass durch doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA) die Expression mancher Proteine reduziert wird (INOUE, 2016; MATZKE et al., 1989; MIZUNO et al., 1984; NAPOLI et al., 1990). Der wissenschaftliche Durchbruch gelang 1998, als Fire und Mello dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* Teilstücke von *unc-22* und *fem-1* Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid, mRNA) injizierten und erkannten, dass die Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) im Vergleich zu einzelsträngiger RNA zu einer wesentlich stärkeren Reduktion der jeweiligen Genexpression führt. Bemerkenswerterweise zeigte sich zudem, dass pro Zelle wenige dsRNA-Moleküle ausreichen, um die Synthese einer überproportional größeren Zahl an Proteinen zu verhindern (FIRE et al., 1998). Diese Entdeckung wurde bald als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet und beschreibt einen Mechanismus, der mittels posttranskriptioneller Regulation ein Gensilencing durch doppelsträngige, kleine RNAs bewirkt (NOVINA, SHARP, 2004). Es wird angenommen, dass RNAi unter anderem als Abwehrmechanismus gegen virales Genmaterial entstanden ist (HAASNOOT et al., 2007). Heute sind verschiedene Familien nichtkodierender RNAs bekannt. Hierzu zählen *small interfering RNAs* (siRNAs) (ELBASHIR et al., 2001a), *microRNAs* (miRNAs, miRs) (LAGOS-QUINTANA et al., 2001) und *piwi-interacting RNAs* (piRNAs) (ELBASHIR et al., 2001b). Ein Fokus der aktuellen Forschung liegt darauf, die Funktion einzelner miRNAs bei der Regulation von Zielgenen und ganzen Signalwegen zu untersuchen.

3.2 miRNAs

MiRNAs sind circa 22 Nukleotid lange, nichtkodierende RNAs, die erstmalig in der Ontogenese von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) beschrieben wurden. Die ersten bekannten miRNAs waren *lin-4* und *let-7*. Sowohl das *lin-4*- als auch das *let-7*-Gen dienen als Vorlage für eine 21-beziehungsweise (bzw.) 22-Nukleotide lange, nicht proteinkodierende RNA, die sich als komplementär zu Sequenzen in den 3'-untranslatierten Regionen (UTRs) von *lin-14*-mRNA erwies (LEE et al., 1993; REINHART et al., 2000). Bei *let-7* handelt es sich um ein evolutionär hochkonserviertes Gen, was eine wichtige biologische Funktion dieses Gens nahelegt (PASQUINELLI et al., 2000). Nachdem weitere RNAs mit ähnlichen Eigenschaften entdeckt worden waren, erkannten Lagos-Quintana et al., Lau et al., sowie Lee und Ambros 2001 deren Zugehörigkeit zu einer bisher unbekannt, gemeinsamen Klasse. Da eine der wenigen Gemeinsamkeiten dieser nichtkodierenden RNAs die ungefähre Länge von gerade 22 Nukleotiden war, wurden diese als miRNAs bezeichnet (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU

et al., 2001; LEE, AMBROS, 2001). Zum jetzigen Zeitpunkt sind 1917 Vorläufer-miRNAs (*precursor-miRNA*, pre-miRNA) und 2654 reife miRNAs annotiert (GRIFFITHS-JONES LAB, 2018; KOZOMARA et al., 2019). Allerdings wird angenommen, dass es sich bei vielen dieser Annotationen um falsch-positive Artefakte handelt (CHIANG et al., 2010). Schätzungen zufolge gibt es circa 2300 reife miRNAs (ALLES et al., 2019; FROMM et al., 2015). MiRNAs können abhängig von ihrer Biosynthese in kanonische und nichtkanonische miRNAs unterschieden werden (BARTEL, 2018).

3.2.1 Biogenese kanonischer miRNAs

Im Zellkern entsteht bei der Transkription eines miRNA-kodierenden Gens durch die RNA-Polymerase II, in seltenen Fällen durch die RNA-Polymerase III, eine sogenannte primäre miRNA (pri-miRNA) (BORCHERT et al., 2006; LEE et al., 2002; LEE et al., 2004). Diese kann eine Länge von mehreren tausend Nukleotiden aufweisen und verfügt darüber hinaus über eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe am 5'-Ende sowie über eine 3'-Polyadenylierung (CAI et al., 2004; LEE et al., 2004). Die pri-miRNA faltet sich unter Bildung mindestens einer Haarnadelstruktur zurück, an die ein Microprozessorkomplex angreifen kann. Dieser besteht aus dem Enzym Drosha, einer RNase III, sowie zwei Molekülen des Bindeproteins *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8) (GREGORY et al., 2006; NGUYEN et al., 2015). Die Haarnadelstruktur wird mit zwei Basenpaaren Differenz an ihrer Basis abgetrennt, wodurch eine circa 60 Basenpaare (bp) lange Vorläufer-miRNA (*precursor-miRNA*, pre-miRNA) entsteht (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LEE et al., 1993; LEE et al., 2003; PASQUINELLI et al., 2000). Das Transportprotein Exportin 5 schleust die pre-miRNA unter *ras-related nuclear protein guanosin triphosphate*(RAN-GTP)-Verbrauch ins Zytoplasma (BOHNSACK et al., 2004; LUND et al., 2004; YI et al., 2003). Dort wird sie von Dicer, einer weiteren RNA-Endonuklease III, die mit *human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein* (TRBP) einen Komplex bildet, prozessiert (GRISHOK et al., 2001; HUTVAGNER et al., 2001). Dicer entfernt die Haarnadelstruktur, wodurch ein miRNA-Duplex entsteht. Dieser besteht aus zwei jeweils 22 Nukleotide langen Einzelsträngen, die um 2 Nukleotide versetzt aneinandergelagert sind. Der miRNA-Duplex wird von einem Argonautenprotein 2 unter ATP Verbrauch mit Hilfe von *heat shock cognate*(Hsc)70/*heat shock protein*(Hsp)90 Chaperonen rekrutiert (HAMMOND et al., 2001; IWASAKI et al., 2010; LIU et al., 2004). Das Argonautenprotein bindet den funktionellen, reifen miRNA Einzelstrang und formt so mit weiteren Proteinen einen *RNA-induced silencing complex* (RISC). Über den genauen Prozess ist allerdings noch wenig bekannt (KOBAYASHI, TOMARI, 2016). Der andere, nicht funktionelle Strang wird verworfen und abgebaut (KOBAYASHI, TOMARI, 2016). Grundsätzlich können beide pre-miRNA-Stränge als reife miRNA fungieren. Die Wahrscheinlichkeit

für das Binden eines Stranges ist von der Nukleotidsequenz des 5'-Endes abhängig, da der Strang mit der schwächeren Doppelstrangpaarung am 5'-Ende bevorzugt gebunden wird (FRANK et al., 2010; KHVOROVA et al., 2003). Der seltener bindende Einzelstrang wurde früher als miRNA* bezeichnet, heute wird der Einzelstrang aus dem 3'-Ende der pre-miRNA als „3p“ und der Strang aus dem 5'-Ende als „5p“ tituiert (KOZOMARA, GRIFFITHS-JONES, 2014). Eingelagert in den RISC bindet die miRNA über ihre sogenannte Seedsequenz, bestehend aus den Nukleotiden 2-8 der miRNA, an eine zur Seedsequenz komplementäre Bindestelle in der 3'UTR eines mRNA-Zielgens (BARTEL, 2009; LEWIS et al., 2003).

Als Folge der Bindung kommt es zu einer posttranskriptionellen Reduktion der Proteinbiosynthese. Da der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist, werden diesbezüglich mehrere Hypothesen diskutiert (FABIAN et al., 2010). Bei kompletter Komplementarität der miRNA zur Bindestelle der mRNA wird die mRNA durch das Argonautenprotein 2 des RISC-Komplexes geschnitten. Bei Mammalia findet die posttranskriptionelle Repression am häufigsten durch den Abbau des Poly-Adenosin(A)-Schwanzes der mRNA unter Zuhilfenahme des *trinucleotide repeat containing gene 6 protein* (TNRC6) statt (GUO et al., 2010; LANDTHALER et al., 2008), wodurch die mRNA destabilisiert und ihr 5'-3'-Verdau eingeleitet wird (CHEN et al., 2009). Die Bindung des RISC-Komplexes an die mRNA bewirkt ebenfalls eine Reduktion der Translationseffizienz. Die Regulation der miRNA-Biosynthese in Tieren setzt bereits bei der Transkription der miRNA an. Neben der Regulation durch die jeweiligen miRNA-Promotoren, die Proteinpromotoren ähneln (CORCORAN et al., 2009), ist die Transkription zudem von der vorhandenen Pol II-Enzymmenge (HA, KIM, 2014; LEE et al., 2004) sowie epigenetischen Regulationsmechanismen wie Methylierung und Histonkomplexbildung abhängig (DAVIS-DUSENBERY, HATA, 2010). Posttranskriptionell wird die miRNA-Biogenese über die Regulation der beteiligten Enzyme beeinflusst. Drosha wird beispielsweise durch Acetylierung stabilisiert (TANG et al., 2013) und die Zusammenlagerung des RISC-Komplexes von Dicer mitgesteuert (MANIATAKI, MOURELATOS, 2005). Abbildung 1 verdeutlicht bildlich die Entstehung der kanonischen miRNAs und bildet mögliche Regulationsmechanismen derselben ab.

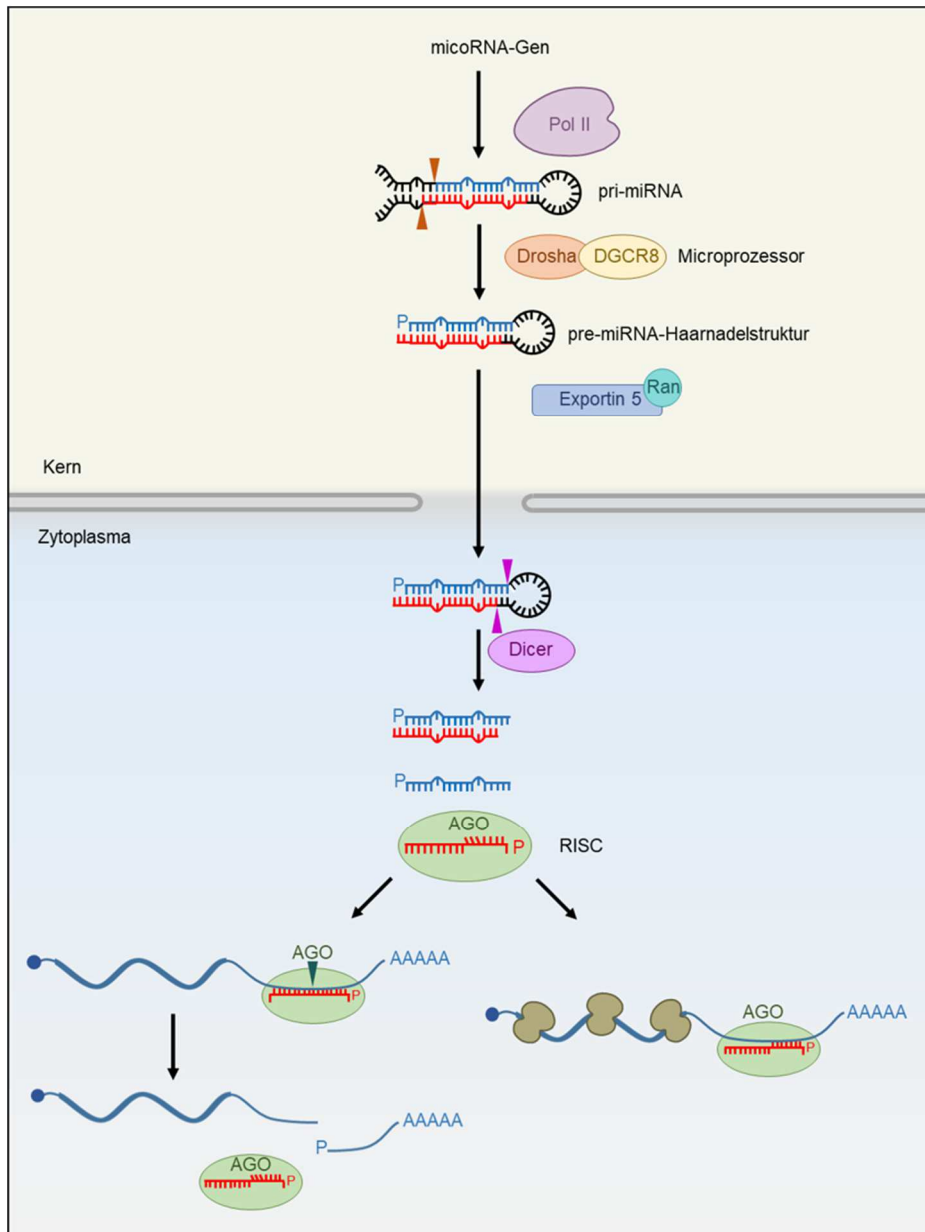


Abbildung 1: Biogenese und Funktion kanonischer miRNAs. Die Transkription des miRNA-Gens erfolgt durch die Pol II. Die hierbei entstandene pri-miRNA lagert sich zu mindestens einer Haarnadelstruktur zusammen. Der Mikroprozessorkomplex, der aus einer RNase III, Drosha, sowie zwei Molekülen des Bindeproteins DGCR8 besteht, trennt die Haarnadelstruktur an der Basis um zwei bp versetzt ab. Diese circa 60 Nukleotide zählende pre-miRNA wird durch Exportin 5-vermittelte Exozytose unter RAN-GTP-Verbrauch ins Zytoplasma transportiert. Die RNA-Endonuklease III Dicer entfernt die Nukleotidschleife, ebenfalls mit zwei bp Strangdifferenz, sodass als Resultat ein miRNA-Duplex mit jeweils zwei Nukleotiden Überhang an den 3' Enden vorliegt. Der miRNA-Duplex wird in einen Argonaute-Protein-Komplex rekrutiert und formt mit weiteren Proteinen durch Bindung des reifen, funktionellen RNA-Stranges den RNA-induced-silencing-Komplex (RISC). Der unreife, nicht gebundene Strang wird abgebaut. Bindet die Seedsequenz der in den RISC eingelagerten miRNA an komplementäre Nukleotidabschnitte in der 3'UTR von mRNAs, werden diese durch Abbau des Poly-Adenosin(A)-Schwanzes destabilisiert oder in ihrer Translation inhibiert. Jeder dieser potenziellen Wirkmechanismen hat eine Reduktion der Proteinmenge zur Folge. Modifiziert nach (BARTEL, 2018)

Bei kanonischen miRNAs erfolgt die Prozessierung der pri-miRNA wie oben beschrieben (GREGORY et al., 2006), während bei nichtkanonischen miRNAs diese Art der Synthese nicht stattfindet. Zu den nichtkanonischen miRNAs werden unter anderem Mirtrons gezählt. Hierbei handelt es sich um Abschnitte in Introns aus mRNAs, die ohne weitere Modifikation direkt die

Haarnadelstruktur der pre-miRNA bilden. Darüber hinaus werden chimärige Haarnadelstrukturen sowie endogene *small hairpin* RNAs (shRNAs) den nichtkanonischen miRNAs zugeordnet (BARTEL, 2018). Kanonische miRNAs liegen im Genom entweder intergenisch zwischen zwei proteinkodierenden Genen oder intronisch als Teil des Introns einer mRNA vor (RODRIGUEZ et al., 2004; WEBER, 2005). Hierbei verfügen intergenische miRNAs über einen eigenen Promotor. Sind mehrere miRNAs auf demselben Genabschnitt in direkter Abfolge kodiert, kann ihre Expression über einen gemeinsamen Promotor reguliert werden. Diese Anordnung von miRNA-Genen wird als miRNA-Cluster bezeichnet (LEE et al., 2002). Die Genexpression intronischer miRNAs wird über den jeweiligen Promotor des jeweiligen Gens mitreguliert. Intronische miRNAs können ebenfalls geclustert innerhalb eines Introns oder einer mRNA vorliegen (ALTUVIA et al., 2005; LAU et al., 2001).

3.2.2 Bedeutung der miRNAs

Bioinformatischen Vorhersagen zufolge wird über 60 Prozent (%) des menschlichen Erbguts durch miRNAs reguliert (FRIEDMAN et al., 2009). Da bei Zielgenvorhersagen auch beim heutigen Stand des Wissens noch viele Bindestellen falsch vorausgesagt werden, muss jede dieser miRNA-Bindestellen experimentell validiert werden (BARBATO et al., 2009). Die Fehleranfälligkeit bioinformatischer Vorhersagen impliziert zugleich, dass es weitere, bislang ungeklärte Faktoren gibt, die einen Einfluss auf die Bindung einer miRNA und damit auf ihre Regulationseffizienz haben. Da verschiedene Gene die miRNA-Biosynthese beeinflussen und eine miRNA wiederum die mRNAs vieler Gene posttranskriptionell reduziert, sind miRNAs an einer großen Anzahl entwicklungsbiologischer und zellulärer Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligt (GROSS et al., 2017; HYDBRING et al., 2017; IVEY, SRIVASTAVA, 2010). Dementsprechend sind Fehlregulationen der miRNA-Expression mit einer Vielzahl an Pathologien wie kardiovaskulären (SAYED et al., 2007; ZHOU et al., 2018), neuronalen (SCHIPPER et al., 2007; WANG et al., 2012) und endokrinologischen Erkrankungen (BOTTONI et al., 2005; ZHOU et al., 2018) sowie mit Krebs (CARNEY, WIERDA, 2005; PENG, CROCE, 2016) assoziiert.

3.3 miR-34a-5p

Viele Krebserkrankungen zeichnen sich durch ein aberrantes miRNA-Expressionsprofil aus. Diese im Tumor fehlexprimierten miRNAs lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. MiRNAs, zu deren Zielgenen Tumorsuppressorgene gehören, sind im Tumor meist überexprimiert und werden aufgrund ihrer tumorfördernden Wirkung OncomiRs genannt. Ein bekannter Vertreter dieser Gruppe ist die miR-21, die Apoptose-inhibierend wirkt und im Glioblastom verstärkt

nachzuweisen ist (CHAN et al., 2005). Zudem gibt es miRNAs, die reprimierend auf die Proto-onkogensynthese wirken und daher Tumorsuppressor-miRNAs genannt werden. Diese miRNAs sind im Tumor oft reprimiert. Auch die miR-34a-5p wird zu den Tumorsuppressor-miRNAs gezählt. Sie wird im Körper ubiquitär exprimiert und reguliert verschiedene Proto-onkogene wie c-Myc und c-Kit (LIANG et al., 2007; LODYGIN et al., 2008; SIEMENS et al., 2013; YAMAMURA et al., 2012). Erstmals wurde ein Zusammenhang zwischen der miR-34a-5p und Krebs beim Neuroblastom hergestellt, als E2F3, ein Zellzyklusregulator, als Zielgen der miR-34a-5p bestätigt werden konnte (WELCH et al., 2007). Weitere Zielgene der miR-34a-5p sind in Abbildung 2 aufgeführt. Eine Deregulierung der miR-34a-5p wurde unter anderem für Darmkrebs (TAZAWA et al., 2007), Lungenkrebs (GALLARDO et al., 2009), Prostatakarzinome (FUJITA et al., 2008; YAMAMURA et al., 2012) sowie Brustkrebs (LI et al., 2013) nachgewiesen.

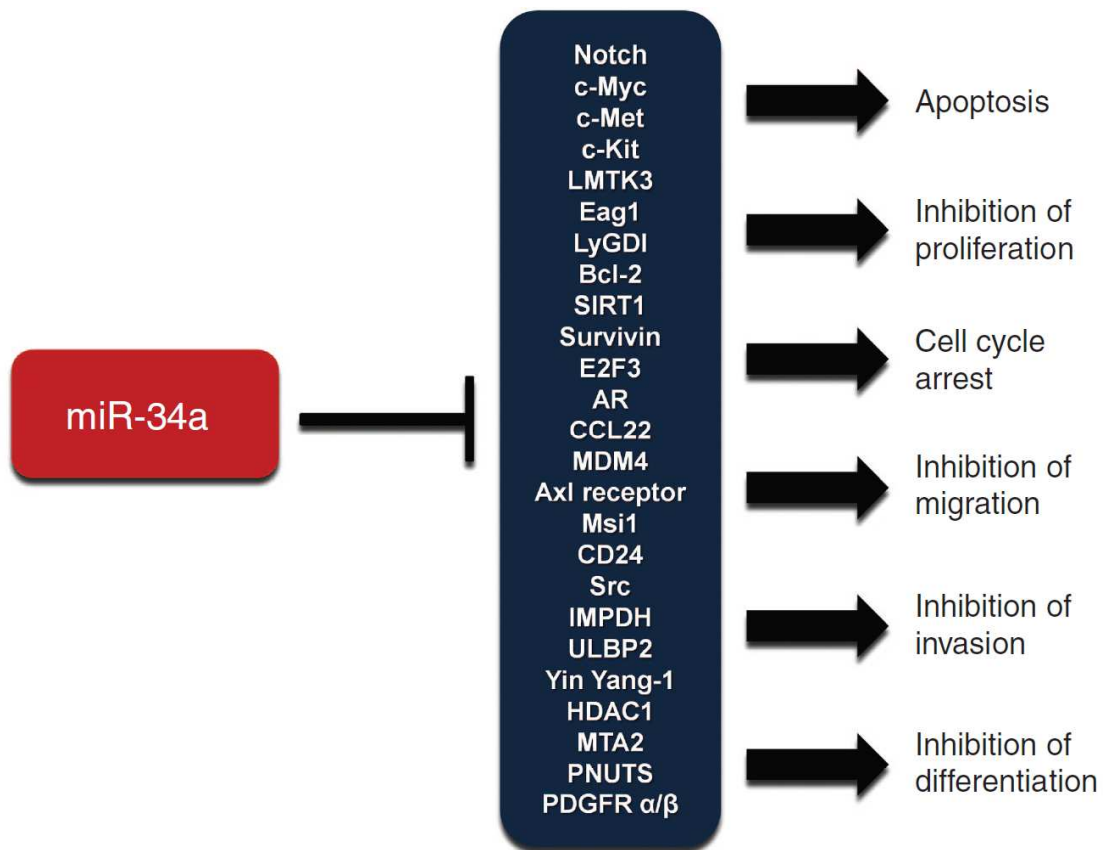


Abbildung 2: Effekte der miR-34a-5p auf die Karzinogenese. Die im dunkelblau hinterlegten Feld aufgeführten Proteine sind als Zielgene der miR-34a-5p bestätigt und werden von dieser posttranskriptionell reprimiert. Diese Zielgene fördern das Überleben und die Proliferation beschädigter Zellen und tragen daher als Onkogene zur Krebsentstehung bei. Rechts ist der tumorsuppressive Effekt aufgeführt, der durch die Repression dieser Targets erzielt wird. Diese Abbildung veranschaulicht, dass die miR-34a-5p über multiple Zielgene vielfältige protoonkogenetische Signale hemmt und so eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung spielt (MISSO et al., 2014).

Die Transkription der miR-34a-5p wird unter anderem von *tumor protein* p53 (TP53, p53) aktiviert (BOMMER et al., 2007). P53 ist ein übergeordneter Tumorsuppressor, der bei Zellstress verstärkt exprimiert wird. Indem er die Transkription von weiteren Tumorsuppressoren induziert, werden Apoptose, Seneszenz und Zellzyklusarrest gesteuert (BIEGING et al., 2014; CRAWFORD et al., 1981). Umgekehrt scheint die miR-34a-5p stabilisierend auf die p53-Expression zu wirken (NAVARRO, LIEBERMAN, 2015). Darüber hinaus wurde die miR-34a-5p als Regulator des *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB)-Signalwegs in T-Zellen identifiziert (HART et al., 2019a). Eine intratumoröse Anreicherung der miR-34a-5p wurde als potenzielle Therapiestrategie bei Krebs getestet. Hierfür wurden liposomale miR-34a-5p-Mimics (MRX34) generiert, die 2017 in einer Phase-I-Studie Patienten mit fortgeschrittenen primären Lebertumoren oder Lebermetastasen verabreicht wurden (BEG et al., 2017). Es wurde eine positive Wirkung des MRX34 auf den Progress von Krebserkrankungen beobachtet, dennoch musste die Studie aufgrund schwerer immunologischer Nebenwirkungen abgebrochen werden (HONG et al., 2020).

3.4 miR-34a-5p und das Immunsystem

Neben den immunologischen Nebenwirkungen, die bei der MRX34-Phase-I-Studie auftraten, wurde ein weiterer Zusammenhang zwischen der miR-34a-5p und dem Immunsystem durch die Analyse des miRNoms verschiedener Immunzellen von Gesunden und an Lungenkrebs erkrankten Personen entdeckt (HART et al., 2016; LEIDINGER et al., 2014). Eine Auswertung der Daten zeigte, dass die miR-34a-5p Expression in *cluster of differentiation*(CD)-3⁺-T-Zellen von Lungenkrebspatienten um das 2,88-fache im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen induziert war (HART et al., 2016). Dies war ein erster Hinweis dafür, dass die miR-34a-5p neben ihrer Rolle als Tumorsuppressor eine wichtige Funktion bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort haben könnte. Durch *in silico*-Zielgenvorhersagen wurden potenzielle Zielgene der miR-34a-5p, die im Zusammenhang mit Immunfunktionen standen, ermittelt und experimentell validiert. Basierend auf diesen Studien konnten miR-34a-5p-Zielgene sowohl im Kalzium- als auch im NF-κB-Signalweg identifiziert werden (DIENER et al., 2018; HART et al., 2019a). Auch andere Studien wiesen Zusammenhänge zwischen der miR-34a-5p und der Funktion des Immunsystems nach. So konnte gezeigt werden, dass die miR-34a-5p die Biogenese des Forkhead-Box-Proteins P3 (FoxP3), eines für die Entwicklung und Funktion von regulatorischen T-Zellen bedeutsamen Transkriptionsfaktors, reduziert, und dass bei allergischem Asthma eine medikamentös verminderte miR-34a-5p-Expression ursächlich für eine Besserung der Symptomatik ist (ALHARRIS et al., 2018). Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten miR-34a-5p-Expression und Graft-versus-Host Reaktionen in der Haut infolge von Stammzelltransplantationen nachgewiesen werden (ATAROD et al.,

2018). Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte in weiterführenden Analysen der Zusammenhang zwischen der miR-34a-5p-Überexpression in Immunzellen und der Chemokinexpression untersucht werden.

3.5 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, gesunde, körpereigene Zellen von erkrankten Zellen und körperfremden Pathogenen zu unterscheiden. Ziel einer Immunantwort ist es, diese Krankheitserreger und entartete Zellen gezielt und so schnell wie möglich zu eliminieren. Das Immunsystem kann funktionell in ein angeborenes (naives) und erworbenes (adaptives) Immunsystem unterteilt werden, diese beinhalten wiederum jeweils zelluläre und humorale Komponenten (HEINRICH, 2014).

Das angeborene Immunsystem vermittelt eine sofortige, unspezifische Reaktion auf Eindringlinge, überbrückt die Zeit bis zur adaptiven Immunantwort, verfügt jedoch nicht über eine Gedächtnisfunktion. Die humorale Komponente des angeborenen Immunsystems stellt das Komplementsystem dar, welches eingedrungene Fremdkörper durch Opsonierung zur Phagozytose markiert oder lysiert (HEINRICH, 2014). Auf zellulärer Ebene wird die angeborene Immunantwort durch Immunzellen, welche Pathogene ohne spezifischen Antigenrezeptor erkennen und über toxische Granula oder Phagozytose zerstören, ausgeführt. Hieran sind Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen beteiligt (HEINRICH, 2014).

Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort reagiert das adaptive Immunsystem spezifisch, wenn auch zeitlich verzögert, durch Antigenerkennung und einer darauffolgenden Bildung von spezifischen Antikörpern auf eine Infektion (HEINRICH, 2014). Diese Antikörper stellen die humorale Komponente des erworbenen Immunsystems dar. Im Gegensatz dazu zählen dendritische Zellen und Makrophagen in ihrer Rolle als Antigenpräsentierende Zellen (APZ) sowie B- und T-Zellen zu den zellulären Bestandteilen des adaptiven Immunsystems (MURPHY, 2018). Über Kontakt mit APZ werden B- und T-Zellen aktiviert, woraufhin B-Zellen spezifische Antikörper gegen das Pathogen bilden, zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) gezielt körpereigene infizierte oder entartete Zellen beseitigen und T-Helfer-Zellen aktivierend auf verschiedene Immunzellen wirken. Nachdem eine Antwort des erworbenen Immunsystems erfolgt ist, werden B- und T-Gedächtniszellen gebildet, sodass bei erneutem Kontakt eine schnellere Antwort auf den Erreger erfolgen kann (MURPHY, 2018).

3.6 Chemokine

Die Regulation des Immunsystems und die Verständigung der Zellen untereinander finden über Zell-Zell-Kontakte und über immunmodellierende Signalmoleküle, sogenannte Zytokine, statt. Der Begriff Chemokin leitet sich von „*chemotactic cytokines*“ ab und bezeichnet eine Untergruppe der Zytokine mit sich ähnelnder dreidimensionaler Struktur, die unter anderem chemotaktisch auf Immunzellen wirken. Die Sekundärstruktur dieser 8-14 Kilodalton (kDa) großen Proteine besteht aus drei antiparallel verlaufenden β -Faltblättern und einer α -Helix am Carboxyende (MILLER, MAYO, 2017; ZLOTNIK, YOSHIE, 2000). Die Tertiärstruktur der Chemokine ist durch Disulfidbrücken gekennzeichnet, welche zwischen Cysteinresten der Aminosäurekette gebildet werden. Abhängig von der Position der Stickstoff(N)-terminalen Cysteine sind Chemokine nomenklatorisch in vier Gruppen unterteilt: Bei den CC-Chemokinen befinden sich zwei Cysteinreste direkt nebeneinander in der Aminosäurekette, während bei den CXC-Chemokinen eine Aminosäure zwischen den beiden Cysteinresten liegt. Neben den zwei großen Gruppen der CC- und CXC-Chemokine existieren zudem XC- und CX3C-Chemokine, von denen jedoch nur wenige Vertreter bekannt sind. Nomenklatorisch steht CXC-L für Ligand, während Rezeptoren als CXC-R bezeichnet werden (FERNANDEZ, LOLIS, 2002; ZLOTNIK, YOSHIE, 2000). Chemokinrezeptoren sind mit Ausnahme von CXCR7 G-Proteingekoppelte Rezeptoren der Klasse A (MURPHY, 1994; ONUFFER, HORUK, 2002). Chemokine sind oft für mehrere Rezeptoren spezifisch (HUGHES, NIBBS, 2018). Sie werden von verschiedenen Zelltypen sezerniert, darunter Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen (JANEWAY, 1992; MURPHY, 2018).

3.7 Die CXC-Chemokinfamilie

Aktuell sind 8 CXC-Chemokinrezeptoren und 17 Liganden, von denen CXCL15 jedoch ausschließlich von Mäusen exprimiert wird, bekannt (CABRERO-DE LAS HERAS, MARTÍNEZ-BALIBREA, 2018; ROSSI et al., 1999). Funktionell werden CXC-Chemokine nach dem Vorhandensein einer Glutaminsäure-Leucin-Argin-Aminosäuresequenz, die zum Aminoende auf die CXC-Sequenz folgt, in ELR-positive und ELR-negative Vertreter eingeteilt. ELR⁺-Chemokine sind für Neutrophilenchemotaxis und -granulation verantwortlich und beteiligen sich zudem über ihre Bindung an CXCR1 und CXCR2 an angiogenetischen Prozessen (BOYLES et al., 2020; DESBAILLETS et al., 1997). ELR⁻-Chemokine regulieren die Lymphozytenchemotaxis und wirken angiostatisch (MURPHY, 2018; STRIETER et al., 1995). Die Liganden CXCL1-3 sowie CXCL5-8 enthalten das ELR-Motiv, während CXCL4, CXCL 9-14 CXCL16 zu den ELR⁻-Chemokinen gezählt werden (BOYLES et al., 2020). CXCL15 und CXCL17 verfügen ebenfalls über keine ELR-Sequenz, weichen jedoch funktionell von den übrigen ELR⁻-Chemokinen ab (CHOREÑO-PARRA et al., 2020; ROSSI et al., 1999).

3.8 Zielsetzung

Chemokine sind Botenstoffe, die als Mediatoren der Chemotaxis einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Immunfunktion leisten. Es ist bekannt, dass die Entstehung von Krebs in engem Zusammenhang mit der Funktion des Immunsystems steht, da sich Krebs erst dann ungehindert ausbreiten kann, wenn entartete Zellen von der körpereigenen Abwehr nicht als solche erkannt werden. T-Zellen spielen im Rahmen der Immunantwort eine zentrale Rolle bei der Aktivierung anderer Immunzellen sowie bei der Erkennung und Zerstörung körpereigener, erkrankter Zellen. Krebserkrankungen gehen daher oft mit einer Funktionsstörung der T-Zellen und des Immunsystems einher (CANDEIAS, GAIPL, 2016; FREY, MONU, 2008). Eine Analyse der miRNA-Expression in Blutzellen von Lungenkrebspatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen identifizierte eine signifikante, 2,88-fache Veränderung der miR-34a-5p-Expression in CD3⁺-T-Zellen, eine 2,04-fache Veränderung in CD19⁺-B-Zellen, eine 1,85-fache Veränderung in CD56⁺-natürlichen Killerzellen (NK) und eine 1,42-fache Veränderung in CD14⁺-Monozyten bei Erkrankten im Vergleich zu den gesunden Probanden (HART et al., 2016; LEIDINGER et al., 2014). Bei einer Literaturrecherche zu Immunzellen und Bronchialkarzinomen zeigte sich, dass eine Infiltration von M1-Makrophagen mit einem besseren Überleben assoziiert ist, während Makrophagen vom M2-Subtyp eine negative Auswirkung auf die Prognose zu haben scheinen (Jakute 2018). Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, zu prüfen, ob eine erhöhte miR-34a-5p-Expression einen Effekt auf relevante M1-Makrophagenfunktionen haben könnte. Da die sowohl die Ergebnisse einer Genexpressionsanalyse als auch bioinformatische Zielgenvorhersagen auf einen möglichen Einfluss der miR-34a-5p auf Chemokinfunktionen hinwiesen, sollte in dieser Arbeit die Regulation der CXC-Chemokinfamilie durch die miR-34a-5p genauer untersucht werden.

4 Material

4.1 Geräte

In Tabelle 1 sind die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Geräte aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammer	Geltray UV-transparent	Renner GmbH
Automatisierte DNA- und RNA-Isolierung	QIAcube	QIAGEN
Bioanalyzer	2100 Bioanalyzer Instrument. Model G2939B	Agilent Technologies Inc.
Blottingkammer	TE42 Standard Transfer Tank	Hoefer Inc.
Brutschränke	Galaxy 170 S	Eppendorf AG
Durchflusszytometer	BD FACSCanto™ II	Becton, Dickinson and Company (BD) Biosciences
Luminometer	Lumat LB 9507	Berthold Technologies GmbH & Co. KG
magnetischer Zelltrenner	MidiMACS™	Miltenyi
Microarray-Hybridisierungssofen	G2545A Hybridization Oven	Agilent Technologies Inc.
Microarray-Scanner	Agilent G2565BA Microarray Scanner System	Agilent Technologies Inc.
Netzgeräte	EPS 601	Amersham Pharmacia Biotech Inc.
	Power Pack P 25T	Analytik Jena AG

Material

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Photometer	NanoDrop™ 2000c	Thermo Fisher Scientific Inc.
	BioPhotometer	Eppendorf AG
Plate Reader für Enzyme-linked Immunosorbent Assays	Victor™ X4 Multilabel Reader	PerkinElmer Inc.
quantitative Echtzeit-PCR(<i>real-time quantitative Polymerase Chain Reaction</i> , qPCR)-Thermocycler	StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Applied Biosystems™
Schüttelinkubatoren	Mixing Block Mb-102	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd.
	Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG
Sicherheitswerkbank	HB 2448 K	Heraeus Holding
Thermocycler	peqSTAR 2X Thermocycler	PEQLAB
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics™
ultraviolette(UV)-Dokumentation	DeVision DBOX	Decon Science Tec GmbH
UV-Fluoreszenz-Dokumentation	ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc.
Wasserbäder	Thermomix® 5BU	B. Braun Melsungen AG
Western-Blot-Gelkammer	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories Inc.
Zellzähl-Gerät	LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter	LOGOS BIOSYSTEMS IS

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	Mikro 185	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
	SIGMA 2-16K mit Kühlung	Sigma Laborzentrifugen GmbH
	UniEquip UNIVAPO 100 H	Uniequip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH
	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG
	Centrifuge 5804	Eppendorf AG
	Color Sprout Mini-Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH
	Costar® Model 10	Sigma Aldrich
	Megafuge 1.OR	Heraeus Instruments GmbH
	Micro Centaur	MSE Centrifuges

4.2 Gerätezubehör

In der Tabelle 2 ist das eingesetzte Gerätezubehör aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung des verwendeten Gerätezubehörs.

Zubehör	Hersteller
LUNA-FL™ Dual Fluorecence Cell Counter <i>counting slides</i>	LOGOS BIOSYSTEMS IS
Hybridization Chamber Kit - <i>SureHyb enabled, stainless</i>	Agilent Technologies Inc.
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gele, 4-15 %	Bio-Rad Laboratories Inc.

4.3 Verbrauchsmaterialien

Die nachfolgende Tabelle 3 zeigt die eingesetzten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Bezeichnung	Hersteller
Nitrozellulosemembran	Amersham™ Protran™ 0,2 µm NC	GE Healthcare Life science
Petrischale	94x16 <i>with vents with logo, light version</i>	Greiner Bio-One GmbH
Photometerküvette	UVette® <i>routine pack</i>	Eppendorf AG
Zellkulturflaschen	Zellkulturflasche, 250 Milliliter (ml), 75 cm ² , PS, Filter-Schraubverschluss rot, transparent, Cellstar® TC	Greiner Bio-One GmbH
Zellulosefilter	Whatman™ #1	Herolab GmbH

4.4 Reaktionskits

In Tabelle 4 sind die eingesetzten Reaktionskits aufgeführt.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Reaktionskits.

Reaktionskit	Hersteller	Artikelnummer
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies Inc.	5067-1511
CD4- T Cell Isolation Kit, <i>human</i>	Miltenyi Biotec	130-096-533
Dual-Luciferase Reporter® Assay System	Promega Corporation	E1960
Human CXCL10/IP-10 DuoSet ELISA	R&D Systems	DY266
Human CXCL11/I-TAC DuoSet ELISA	R&D Systems	DY672
miRNeasy Micro Kit	QIAGEN	217084
miRNeasy Mini Kit	QIAGEN	217004

Reaktionskit	Hersteller	Artikelnummer
miScript II RT Kit	QIAGEN	218181
miScript SYBR® Green PCR Kit	QIAGEN	218073
NucleoBond®PC 100	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	740573.100
NucleoSpin®Gel und PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	740609.250
Omniscript RT Kit	QIAGEN	205111
pGEM®-T Easy Vector-System	Promega Corporation	A1360
SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8x60K Microarray Kit	Agilent Technologies Inc.	G4851C

4.5 Chemikalien

In Tabelle 5 sind die verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 5: Auflistung aller eingesetzten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Invitrogen™
Ampicillin	Bayer AG
bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH
doppelt destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	große Volumina: Aufbereitet mit der institutseigenen Merck Milipore Anlage kleine Volumina: Ambion™ nukleasefreies Wasser, Thermo Fisher Scientific Inc.
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	F. Hoffmann- La Roche AG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Durchflusszytometrieträgerflüssigkeit BD™ FACSTy™ Trägerflüssigkeit	2019 Thermo Fisher Scientific Inc.
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich (Merck)
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG

Material

Chemikalie	Hersteller
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG
FicoLite®-H	Linaris Blue
fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH
Gel Loading Dye Purple	New England BioLabs GmbH
Glucose	Merck KGaA
Glycerin	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt Bacto™	Becton, Dickinson and Company (BD)
HiPerFect™	QIAGEN N.V.
Interferon gamma (<i>recombinant human IFN-γ</i>)	2017 PeproTech Inc.
Ionomycin	Sigma
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Lipopolysaccharides (LPS)	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Paraformaldehyd	Sigma
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma
PolyFect™	QIAGEN N.V.
PonceauS™	Sigma-Aldrich
SignalFire™ Elektrochemolumineszenz (ECL)-Reagens	Cell Signaling Technology Inc.
SignalFire™ Elite ECL-Reagens	Cell Signaling Technology Inc.
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Serva Electrophoresis GmbH
Trypan Blue	Sigma®

Chemikalie	Hersteller
Trypton (Bacto™)	Becton, Dickinson and Company (BD)
Tween®20	Serva Electrophoresis GmbH
X-Gal (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich (Merck)

4.6 Puffer und Lösungen

In Tabelle 6 werden die eingesetzten Puffer und Lösungen sowie ihre Zusammensetzung aufgeführt.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Menge/Konzentration
1× Tris-Acetat-EDTA (TAE)- Agarosegelelektrophoresepuffer	Tris-HCl (2 g/mol (M)) Essigsäure (1 M) Ethylendinitrilotetraessig- säure (EDTA) 80-100 ml 25 %HCl	242,2 Gramm (g) 57,1 ml 18,6 g <i>ad potentia hydrogenii</i> (pH) 8,0
Blockingpuffer	<i>Tris-buffered saline</i> (TBS)- Puffer Milchpulver Tween®20	0,05 % Gewicht/Volumen (w/v) 0,05 % (v/v)
dNTPs	Desoxyadenosintri-phosphat (dATP) Desoxycytosintri-phosphat (dCTP) Desoxyguanosintri-phosphat (dGTP) Desoxythymidintri-phosphat (dTTP)	10 mM 10 mM 10 mM 10 mM

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Menge/Konzentration
Ethidiumbromid	Ethidiumbromid	10 mM
<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (FACS)-Puffer	Paraformaldehyd NaCl Natriumhydroxid (NaOH)	1% (w/v) 8,5 g/l ad pH 7,4
Natriumdodecylsulfat(SDS)- Laufpuffer	Glycin SDS 20 % Trishydroxymethyl- aminomethan (Tris) doppelt destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	72 g 25 ml 15 g ad 5 Liter (l)
TBS	NaCl Tris ddH ₂ O 25 % HCl	87,66 g 24,2 g ad 1 l ad pH 7,5
<i>Tris-buffered saline with Tween</i> (TBST)	TBS Tween®20	0,05 % (v/v)
Transferpuffer für Western Blot	Glycin Methanol SDS 20 % Tris ddH ₂ O	72 g 1l 12,5 ml 15 g ad 5 l

4.7 Größenmarker

Zur Auswertung der Agarosegelelektrophoresen wurde die Quick-Load® Purple 2-Log DNA-Ladder der New England BioLabs GmbH als Größenstandard verwendet. Dieser Standard umfasst einen Umfang von 100-10.000 bp.

4.8 Enzyme

In Tabelle 7 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme aufgeführt.

Tabelle 7: Auflistung der eingesetzten Enzyme.

Enzym	Hersteller
rAPid Alkaline Phosphatase (RAP)	F.Hoffman-La Roche AG
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs GmbH
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs GmbH
<i>Thermus Aquaticus</i> (Taq)-DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA (Gibco by life technologies)	Thermo Fisher Scientific Inc.

4.9 Antikörper

4.9.1 Western-Blot-Antikörper

In Tabelle 8 sind die in dieser Arbeit zur verwendeten Western Blot-Antikörper aufgeführt.

Tabelle 8: Auflistung der eingesetzten Western Blot-Antikörper.

Antikörper gegen	Nummer	Spezies	Firma	Verdünnung
CXCR3	6H1L8	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific	1:500 in 5 % TBST-Milch
α -Tubulin	11H10	Kaninchen	CST	1:1000 in 5 % BSA/TBST
rabbit-Immunglobulin G (IgG)	A0545-1ML	Ziege	SIGMA-Aldrich	1:3000 in 5 % TBS-Milch

4.9.2 Durchflusszytometrie-Antikörper

In

Tabelle 9 sind die eingesetzten Durchflusszytometrie-Antikörper aufgeführt.

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Durchflusszytometrie-Antikörper.

Name	Artikelnummer	Hersteller
Fluorescein Isothiocyanat (FITC) Mouse Anti-Human CD4 Clone RPA-T4	555346	BD Pharmingen™
Allophycocyanin (APC) Mouse Anti-Human CD183 Clone 1C6/CXCR3	561324	BD Pharmingen™
APC Mouse IgG1 κ Isotype Control Clone MOPC-21	550854	BD Pharmingen™
Alexa Fluor® 488 Mouse Anti-Human CD14 Clone M5E2	557700	BD Pharmingen™
Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human CD68 Clone Y1/82A	562111	BD Pharmingen™
FITC Mouse Anti-Human CD163, Clone GHI/61	563697	BD Pharmingen™
CD80-PE Mouse Anti-Human, Clone MAB104	IM1976U	Beckman Coulter Immunotech

4.9.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA)-Antikörper

In Tabelle 10 sind die eingesetzten ELISA-Antikörper aufgeführt.

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten ELISA-Antikörper.

Name	Artikelnummer	Hersteller
Human CXCL10/IP10 DuoSet ELISA	DY266	R&D Systems
Human CXCL11/I-TAC DuoSet ELISA	DY672	R&D Systems

4.10 Oligonukleotide

4.10.1 Klonierungsprimer

Sämtliche Primer, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, stammen von der Firma Eurofins. Sie wurden in lyophilisiertem Zustand geliefert und entsprechend der Herstellerangaben in nukleasefreiem ddH₂O gelöst.

4.10.1.1 Forward-Primer

In Tabelle 11 sind sämtliche Forward-Primer mit ihren jeweiligen Restriktionsschnittstellen sowie den eingesetzten Restriktionsendonukleasen abgebildet. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der New England Biolabs GmbH bezogen.

Tabelle 11: Auflistung aller Forward-Primer mit Restriktionsschnittstellen sowie den jeweils eingesetzten Restriktionsendonukleasen zur Klonierung der jeweiligen Zielgene.

Zielgen	Primersequenz 5 →'3' (Restriktionsschnittstelle unterstrichen)	Restriktionsendonuklease
<i>CXCR1</i>	GG <u>ACTAGT</u> GTTGTGTGTGGAAGGTGATC	<i>Spe</i> I
<i>CXCR2</i>	GG <u>ACTAGT</u> CCCTTGCATGGTTTAGAAAGCT TGCC	<i>Spe</i> I
<i>CXCR3</i>	GG <u>ACTAGT</u> GATTCATCCTGGTCTGAGAC	<i>Spe</i> I
<i>CXCL1</i>	GG <u>ACTAGT</u> GAAAGCTCACTGGTGGCTGTTC	<i>Spe</i> I
<i>CXCL2</i>	GG <u>ACTAGT</u> GACCAGAAGGAAGGAGGAAG	<i>Spe</i> I
<i>CXCL5</i>	GG <u>ACTAGT</u> GTGTGAGCCAGGAATCACTG	<i>Spe</i> I
<i>CXCL10</i>	GG <u>ACTAGT</u> GATGCAGTGCTTCCAAGGATG	<i>Spe</i> I
<i>CXCL11</i>	GG <u>ACTAGT</u> GTGAAGGATGAAAGGTGGGTG AAAG	<i>Spe</i> I
<i>CXCL12</i>	GG <u>ACTAGT</u> CTTGTTTGGAGCATCTCCTCTG	<i>Spe</i> I
<i>CXCL14</i>	GG <u>ACTAGT</u> GCAGTGTTGCTCCATTCCTAGC	<i>Spe</i> I
<i>CXCL16</i>	GG <u>ACTAGT</u> GCTGTTATGGAACCTCCTGAG	<i>Spe</i> I

4.10.1.2 Reverse-Primer

In Tabelle 12 sind sämtliche Reverse-Primer mit ihren jeweiligen Restriktionsschnittstellen sowie den eingesetzten Restriktionsendonukleasen abgebildet.

Tabelle 12: Auflistung aller Reverse-Primer mit Restriktionsschnittstellen sowie den jeweils eingesetzten Restriktionsendonukleasen zur Klonierung der jeweiligen Zielgene.

Zielgen	Primersequenz 5'→3' (Restriktionsschnittstelle unterstrichen)	Restriktionsendonuklease
<i>CXCR1</i>	<u>GCCGGCG</u> CATTTGGGGAGGGACTGGTG	<i>Nae I</i>
<i>CXCR2</i>	<u>GCCGGCG</u> GATATTGAATGAAATCATTTAAC	<i>Nae I</i>
<i>CXCR3</i>	<u>CGAGCTC</u> GGTCCTGACGATCTTGTTTATTG	<i>Sac I</i>
<i>CXCL1</i>	<u>CGAGCTC</u> CCAGATTTTCCAGTAAAGGTAGCCC	<i>Sac I</i>
<i>CXCL2</i>	<u>CGAGCTC</u> CGAAACCTCTCTGCTCTAAC	<i>Sac I</i>
<i>CXCL5</i>	<u>CGAGCTC</u> CATTCCAAGCTCTCTCTGGTC	<i>Sac I</i>
<i>CXCL10</i>	<u>CGAGCTC</u> CTTATGTAACATGCAGAGC	<i>Sac I</i>
<i>CXCL11</i>	<u>CGAGCTC</u> GATGTGCTACATGATGTTTGGGG	<i>Sac I</i>
<i>CXCL12</i>	<u>CGAGCTC</u> GTCTTTTGCGGGTAAGCAG	<i>Sac I</i>
<i>CXCL14</i>	<u>CGAGCTC</u> GAAACCTGCATGCAATGCTAATGG	<i>Sac I</i>
<i>CXCL16</i>	<u>CGAGCTC</u> CGGAACAACCTGGTGTACTGGGAG	<i>Sac I</i>

4.10.2 pMIR-RNL-TK-Primer

Der pMIR-RNL-TK-Primer dient zur Vervielfältigung der Multiple Cloning Site (MCS) des pMIR-RNL-TK-Plasmids. Der Forward-Primer bindet 111 Basenpaare (bp) upstream, der Reverse-Primer 107 bp downstream der MCS. In Tabelle 13 sind die Sequenzen der pMIR-Oligonukleotidprimer abgebildet.

Tabelle 13: Sequenzen der pMIR-Oligonukleotidprimer.

Primernamen	Primersequenz 5'→3'
pMIR-RNL-TK-Forward	CGAAGTACCGAAAGGTCTTACCG
pMIR-RNL-TK-Reverse	TTTGTATGCGGCCGCTAGCTTGG

4.10.3 Mutageneseprimer

Mutageneseprimer dienen der Mutation der vorhergesagten miR-34a-5p-Bindestelle in der 3'UTR. Um den Erfolg der Mutation zu überprüfen, wird die Bindestelle durch die Schnittstelle eines Restriktionsenzym ersetzt. In Tabelle 14 sind die Nukleotidsequenzen der verwendeten Mutageneseprimer aufgeführt.

Tabelle 14: Nukleotidsequenzen der eingesetzten Mutageneseprimer.

Zielgen	Forward-Primersequenz 5'→3' Richtung (eingefügte Schnittstelle unterstrichen)	Eingefügte Schnittstelle für
<i>CXCR1</i>	GCTGGAGACATTGAGGCAGGTCGCGAGAAAACATCAACC TGCCAGC	<i>Nru I</i>
<i>CXCR3</i>	GGCTGCCTGGAGCCCTCGCGAGCTTCTCATTGGAAAC	<i>Nru I</i>
<i>CXCL1</i>	GTCTTTCTTGTAAGGCATTGCGGATTGTTTAATGGTAGTT TTACAG	<i>Nru I</i>
<i>CXCL10</i>	CTTCATGGACTTCTCGCGAGATCCTCCCAAGGG	<i>Nru I</i>
<i>CXCL11</i>	GAATGACAATCAGAATTCTCGCGAGCAAAGGAGTCCAAC AATTAAATG	<i>Nru I</i>
<i>CXCL14</i>	CTTAAGAACGCCCCCTCCACATCGCGAGCCCCAGTATAT GCCGCATTG	<i>Nru I</i>
<i>CXCL16</i>	CATAGGACTAACCAGCCACGTGGCTCTCTTAGGCCCTC ATTTAAAACG	<i>Pm II</i>

4.10.4 Synthetische miRNAs und Kontrollen

Um eine Überexpression der miR-34a-5p nachzubilden, wurde das miScript-miRNA-Mimic MIMAT0000255 von QIAGEN mit der Sequenz 5'UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU eingesetzt.

Als Transfektionskontrolle wurde die AllStars *negative control small interfering RNA* (ANC) von QIAGEN, Artikelnummer 1027281 eingesetzt.

4.11 Plasmide

4.11.1 pGEM

Der pGEM®-T Easy-Vektor der Promega Corporation wird zur Klonierung von Polymerasekettenreaktions(PCR)-Produkten eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde er durch einen Verdau durch die Restriktionsendonuklease *EcoR* V linearisiert und mit Poly-Thymidin(T)-Überhängen ligiert (PROMEGA, 2021). PCR-Produkte verfügen über Adenosinüberhänge und können daher direkt in den pGEM®-T Easy-Vektor integriert werden. Die Polylinkerregion liegt in dem Teil des *LacZ*-Gens, der für die α -Kette der β -Galaktosidase codiert. Normalerweise setzt β -Galactosidase X-Gal zu einem blauen Farbstoff um. Eine erfolgreiche Insertion eines Oligonukleotids zerstört jedoch das *LacZ*-Gen, sodass eine Blau-Weiß-Selektion (siehe 5.2.3) nach Transformation in Bakterien zur Identifizierung von Kolonien, die das klonierte Insert enthalten, durchgeführt werden kann. Durch ein Ampicillinresistenzgen innerhalb des pGEM-Plasmids kann das Wachstum von nicht-transformierten Bakterien unterbunden werden (PROMEGA, 2021). Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau eines pGEM®-T Easy-Vektors.

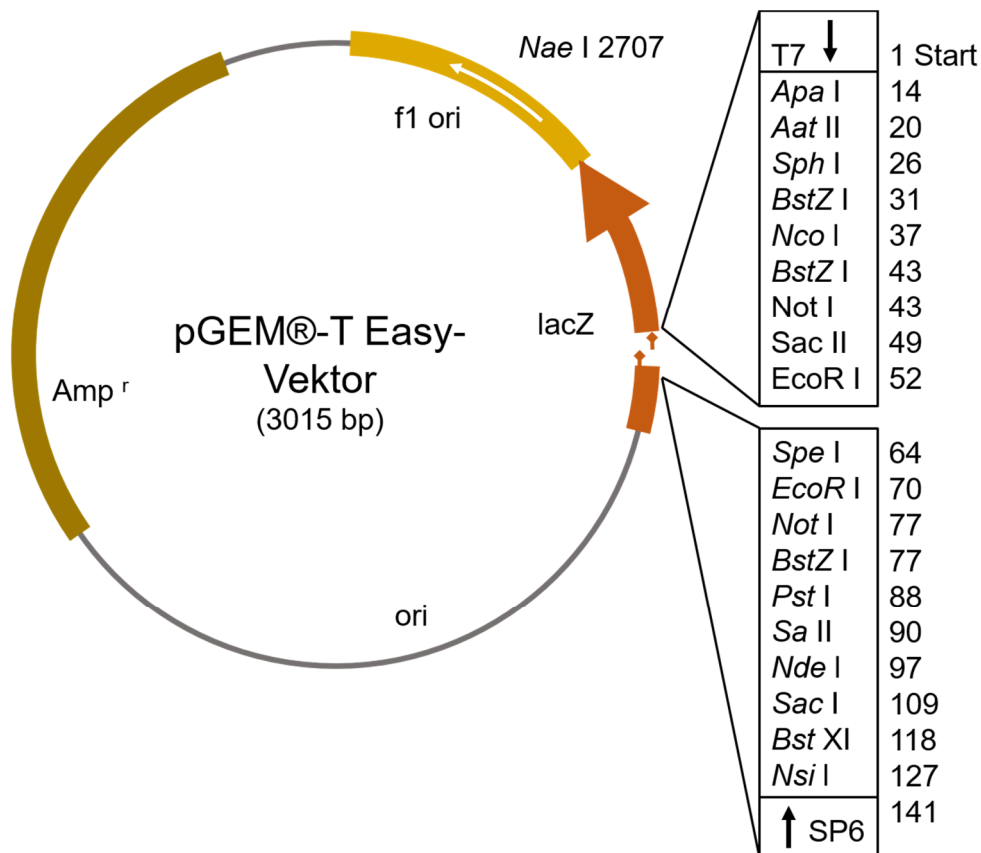


Abbildung 3: Vektorkarte des pGEM®-T Easy (Promega Corporation). Das Plasmid enthält ein *LacZ*-Gen, in dem sich die MCS, die von Poly(T)-Sequenzen eingerahmt ist, befindet. Bei erfolgreicher Ligation wird das β -Galaktosidase-Gen zerstört, wodurch die Kolonien X-Gal nicht in einen blauen Farbstoff umsetzen können und weiß bleiben. Zudem verfügt der pGEM Vektor über ein Ampicillinresistenzgen, welches die Positivselektion transformierter Bakterien auf dem ampicillinhaltigen Agarboden ermöglicht. Modifiziert nach (PROMEGA, o.D).

4.11.2 pSG5

Der eukaryotische pSG5-Vektor der Firma Stratagene ermöglichte in dieser Arbeit die hohe intrazelluläre Expression der miR-34a-5p in den transfizierten Zellen. Dieser enthält einen T7-Promotor sowie einen *simian virus* (SV40)-Promotor mit Polyadenylierungssignal, welches bei Eukaryoten für die ausgeprägte Replikation des pSG5-Vektors *in vivo und in vitro* sorgt. Prokaryotische Transkriptasen können an die Replikationsursprünge f1 ori sowie pUC ori binden. Daneben enthält der pSG5 Vektor eine MCS mit den Restriktionsschnittstellen *BamHI*, *BglII* und *EcoRI* sowie ein Ampicillinresistenzgen für die Positivselektion transformierter Bakterien (AGILENT TECHNOLOGIES, o. D.). In Abbildung 4 ist schematisch der Aufbau des pSG5-Expressionsplasmids dargestellt.

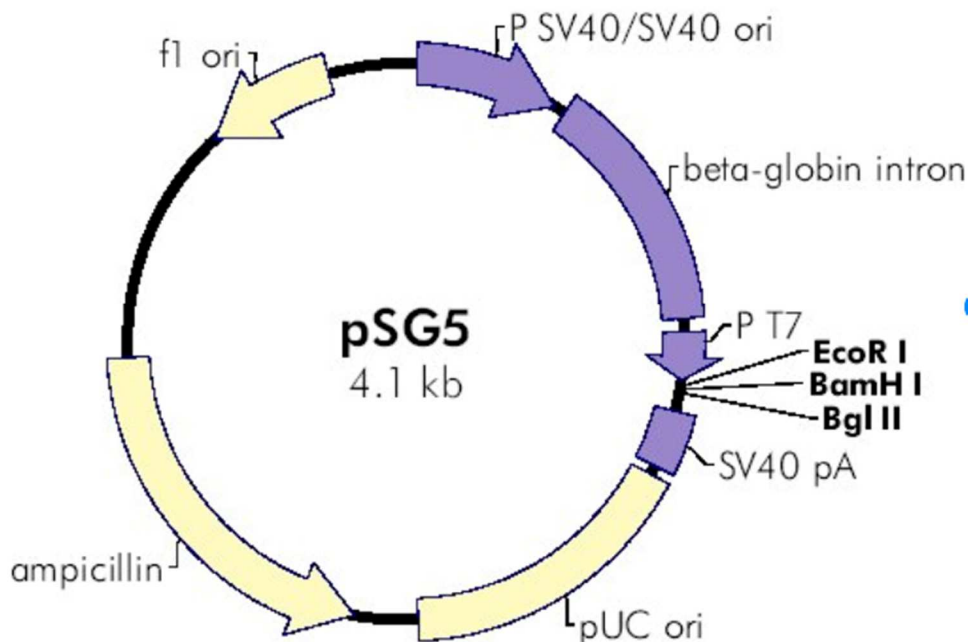


Abbildung 4: Vektorkarte des pSG5-Expressionsplasmids (Agilent Technologies, Stratagene). Ursächlich für die hohe Replikationsrate des 4,1 Kilobasen (kb) langen pSG5-Vektors *in vivo* sind der SV40-Promotor sowie das zugehörige Polyadenylierungssignal. Die MCS enthält Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *BamHI* sowie *BglII*. Das Ampicillinresistenzgen ermöglicht die Positivselektion erfolgreich transformierter Bakterien (AGILENT TECHNOLOGIES, o. D.).

4.11.3 pSG5-miR-34a-5p

Das verwendete pSG5-miR-34a-5p-Expressionsplasmid wurde von der Arbeitsgruppe Meese zu Verfügung gestellt. Zur Klonierung des Plasmids wurde die miR-34a-5p-Sequenz sowie die umliegenden 100 bp beidseits, flankiert von Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* und *BglII*, von Eurofins synthetisiert. Das Oligonukleotid sowie der pSG5-Vektor wurden mit *EcoRI/BglII*

II verdaut und ligiert. Nach Überprüfung des Klonierungserfolgs wurde die miRNA-Expression mittels qPCR und Northern Blot bestätigt (HART et al., 2016).

4.11.4 pMIR-RNL-TK

Der eukaryotische pMIR-REPORT™-Vektor von Ambion dient der Untersuchung der Effekte einer miRNA auf eine 3'UTR. Die 3'UTR wird in die MCS des Vektors eingefügt, die sich am 3'-Ende des Firefly Luciferase Gens befindet. Die Expression der Firefly-Luciferase wird durch die klonierte 3'UTR kontrolliert. Für die Luciferaseexperimente wurde ein durch die Arbeitsgruppe Meiser modifizierter pMIR REPORT™ Vektor, pMIR-RNL-TK, mit einem zusätzlichen, konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase-Gen, verwendet. Die Renilla-Luciferase-Aktivität dient der Normierung der Transfektionseffizienz. Darüber hinaus verfügt der pMIR-RNL-TK-Vektor ebenfalls über eine Ampicillinresistenz, welche die Selektion korrekt transformierter Bakterien ermöglicht. Abbildung 5 zeigt den Aufbau des pMIR-RNL-TK-Vektors.

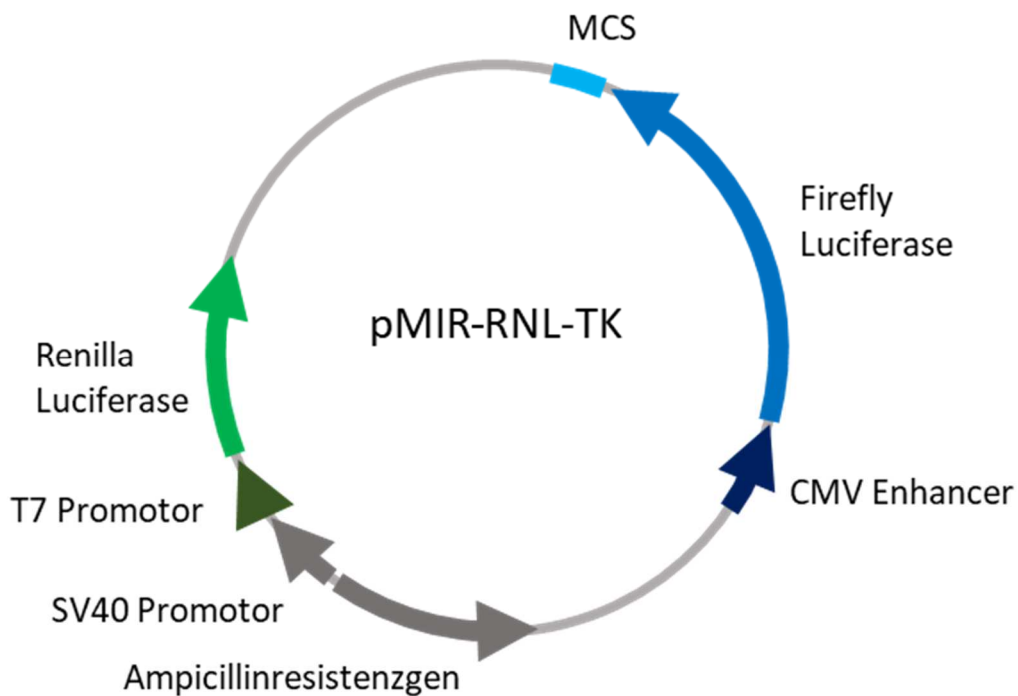


Abbildung 5: Vektorkarte des pMIR-RNL-TK. Der als Reporterplasmid verwendete Vektor verfügt über ein Cytomegalievirus(CMV)-Enhancer-gesteuertes Firefly-Luciferase-Gen, an welches sich direkt 3' die MCS des Vektors anschließt. Somit bildet ein Insert die 3'UTR, unter deren Kontrolle die Firefly-Luciferase steht. Weiterhin verfügt der pMIR-RNL-TK über ein Renilla-Luciferase-Gen, welches unabhängig von der MCS exprimiert wird, sowie über ein Ampicillinresistenzgen (BEITZINGER et al., 2007).

4.11.5 Reporterplasmide

Die in Tabelle 15 aufgeführten Reporterplasmide wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit hergestellt. Um die Korrektheit der gesamten klonierten Nukleotidsequenz, insbesondere der miRNA-Bindestelle, zu gewährleisten, wurden die klonierten Plasmide zur Sequenzierung zur Seq-It GmbH nach Kaiserslautern geschickt.

Tabelle 15: Liste aller in dieser Arbeit klonierten Wildtyp-pMIR-RNL-TK-Plasmide mit jeweiliger Zielgen-3'UTR, der als Vorlage verwendeten Matrizen-Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit National Center for Biotechnology Information (NCBI)-Referenznummer, der Größe des Inserts, sowie Art und Anzahl der vorhergesagten miR-34a-5p-Bindestellen.

Name	NM-Nummer (NCBI-Referenznummer)	Insertgröße	Bindestellen
pMIR-RNL-TK <i>CXCR1</i> -3'UTR	NM_000634.2	1129	1x 7mer 2x 5mere
pMIR-RNL-TK <i>CXCR2</i> -3'UTR	NM_001557.3	1179	2x 5mere
pMIR-RNL-TK <i>CXCR3</i> -3'UTR	NM_001504.1	496	1x 7mer 5x 5mere
pMIR-RNL-TK <i>CXCL1</i> -3'UTR	NM_001511.3	743	1x 6mer 1x 5mer
pMIR-RNL-TK <i>CXCL2</i> -3'UTR	NM_002089.3	667	1x 6mer 1x 5mer
pMIR-RNL-TK <i>CXCL5</i> -3'UTR	NM_002994.4	738	1x 6mer
pMIR-RNL-TK <i>CXCL10</i> -3'UTR	NM_001565.3	680	1x 7mer 1x 5mer
pMIR-RNL-TK <i>CXCL11</i> -3'UTR	NM_005409.4	457	1x 7mer
pMIR-RNL-TK <i>CXCL12</i> -3'UTR	NM_199168.3	523	1x 7mer 1x 5mer
pMIR-RNL-TK <i>CXCL14</i> -3'UTR	NM_004887.4	727	1x 7mer 1x 5mer
pMIR-RNL-TK <i>CXCL16</i> -3'UTR	NM_022059.3	695	1x 7mer 2x 5mere

4.11.6 Mutierte Reporterplasmide

Bei signifikanter Reduktion der Luciferaseaktivität durch miR-34a-5p-Überexpression des Wildtyp-3'UTR-Reporterplasmids gegenüber der Kontrolle wurde die fragliche miR-34a-5p-Bindestelle mutiert (mut) und durch eine Restriktionsendonukleasenschnittstelle ausgetauscht. Die Sequenz der eingefügten Schnittstelle lässt sich Tabelle 14 entnehmen.

4.12 Bakterienstämme, eukaryotische Zelllinien, humane primäre Zellen

4.12.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Zur Klonierung der Reporterkonstrukte, Vervielfältigung der Plasmide sowie zur Blau-Weiß-Selektion wurden kompetente *E. coli*-Bakterien des Stammes NEB®5-alpha der New England BioLabs GmbH verwendet.

4.12.2 HEK293T

Die menschliche embryonale Nierenzelllinie HEK293T ist eine humane adhärente Zelllinie, die seit den 1970er Jahren gezüchtet wird und ursprünglich aus humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney cell*, HEK) stammt. Diese Zelllinie wurde durch Transformation mit Fragmenten des Adenovirus 5-Genoms immortalisiert (GRAHAM et al., 1977). Zudem enthält sie ein großes SV40 T-Antigen, welches den Start einer Transkription an einem SV40-Promotor ermöglicht, über den viele Plasmide, unter anderem pMIR-RNL-TK und pSG5, verfügen (SHEIN, ENDERS, 1962; SHEIN et al., 1962). Die HEK293T-Zelllinie ist relativ unempfindlich und lässt sich daher gut in der Zellkultur einsetzen. Die HEK293T-Zelllinie wurde vom Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH erworben.

4.12.3 Primäre Zellen

Die verwendeten CD4⁺-T-Zellen und Monozyten wurden aus dem Vollblut von drei alterskorrelierten Spenderinnen gewonnen. Die Aufreinigung, Polarisierung und Stimulierung bzw. Aktivierung erfolgte nach den in Abschnitt 5.3.4 beschriebenen Methoden.

4.13 Nährmedien für Bakterien und Zellen

4.13.1 Bakterielle Nährmedien

In .

Tabelle 16 sind die verwendeten bakteriellen Nährmedien sowie ihre jeweilige Zusammensetzung aufgeführt.

Tabelle 16: Eingesetzte bakterielle Nährmedien.

Nährmedium	Inhaltsstoffe	Menge
flüssiges <i>lysogeny broth</i> (LB)-Medium (900 ml)	Hefeextrakt	4,5 g
	NaCl	9 g
	Trypton	9 g
	ddH ₂ O	ad 900 ml
LB-Agarplatten	Agar	13,5 g
	LB-Medium	ad 900 ml
<i>super optimal broth with Catabolite repression</i> (SOC) <i>outgrowth</i> Medium		New England BioLabs GmbH

4.13.2 Zellkulturmedien

In Tabelle 17 sind die verwendeten Zellkulturmedien sowie ihre jeweilige Zusammensetzung aufgeführt.

Tabelle 17: Eingesetzte Zellkulturmedien.

Zellkulturmedium	Hersteller
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) mit hohem Glukoseanteil und Pyruvat	Thermo Fisher Scientific
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) versetzt mit Penicillin/Streptomycin und FKS	10 % FKS 1 % Pen/Strep
FKS	PAA Laboratories GmbH
M1-Macrophage Generation Medium DXF	PromoCell
Macrophage Detachment Solution DXF	PromoCell
Monocyte Attachment Medium	PromoCell

Zellkulturmedium	Hersteller
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1670 Medium mit L-Glutamin und Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich
RPMI 1670 Medium versetzt mit 10% FKS und 1 % Pen/Strep	10 % FKS 1 % Pen/Strep

4.14 Computerprogramme

In Tabelle 18 sind die verwendeten Computerprogramme aufgeführt.

Tabelle 18: Eingesetzte Computerprogramme.

Computerprogramm	Herausgeber
Agilent 2100 Expert Software	Agilent Technologies Inc.
Agilent Genomic Workbench Feature Extraction 10.7.1.1	Agilent Technologies Inc.
BD FACSDiva™ Software	BD Biosciences
CorelDRAW Graphics Suite 12	Corel Corporation
DeVision G Version 2.0	Decon Science Tec GmbH
Endnote X7	Clarivate Web of Science™
GeneSpring 14.9	Agilent Technologies Inc.
Image Lab 6.0	Bio-Rad Laboratories Inc.
Microsoft Office Excel 2013	Microsoft Corporation
Microsoft Office Power Point 2013	Microsoft Corporation
Microsoft Office Word 2013	Microsoft Corporation
SigmaPlot Version 10.0	Systat Software GmbH
StepOne™ Software	Thermo Fisher Applied Biosystems
WorkOut Plus MMD	PerkinElmer Inc.

4.15 Websites

In Tabelle 19 sind die verwendeten Websites aufgelistet.

Tabelle 19: Eingesetzte Websites.

Name der Website	Internetadresse
National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/
GeneTrail 2.0 und 3.0	https://genetrail.bioinf.uni-sb.de/
MirWalk 2.0	http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/custom.html
National Center for Biotechnology Information (NCBI) Blast	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
STRING database Version 11.0	https://string-db.org/
Human TargetScan 7.2	http://www.targetscan.org/vert_72/
Webcutter 2.0	http://heimanlab.com/cut2.html

5 Methoden

5.1 DNA-Techniken

5.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(MULLIS et al., 1986)

Die PCR dient der zielgerichteten *in vitro*-Vervielfältigung einer gewünschten Nukleotidsequenz. Für die PCR werden eine DNA-Vorlage (Template), in der die gewünschte Sequenz enthalten ist, Primer, eine thermostabile Polymerase, meistens eine *Thermus aquaticus*(Taq)-Polymerase, Desoxyribonukleotide sowie ein Puffer benötigt. Um Verunreinigungen des Ansatzes ausschließen zu können, wird eine Negativkontrolle ohne Template bei der PCR mitgeführt. In Tabelle 20 ist ein klassischer PCR-Ansatz abgebildet.

Tabelle 20: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes. Ein Kolonie-PCR-Ansatz entspricht einem halben PCR-Ansatz. Anstelle von cDNA (*complementary deoxyribonucleic acid*) wurde hierbei die Kolonie hinzugegeben.

Reagenz	Endkonzentration	eingesetztes Volumen
10×Taq-Puffer	1×	10 µl
dNTPs	100 mM	2 µl
Forward-Primer	25 ng/µl	1 µl
Reverse-Primer	25 ng/µl	1 µl
Taq-Polymerase	500 ng	0,5 µl
cDNA	1000 ng	variabel
nukleasefreies ddH ₂ O		ad 50 µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Hierbei wurde der Ansatz für festgelegte Zeiten bei spezifischen Temperaturen inkubiert, deren Abfolge sich wiederholte. Die Temperaturphasen des Cyclers sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Thermocyclerprogramm zur Durchführung einer PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer und Anzahl Wiederholungen	
initiale Denaturierung	95 Grad Celsius (°C)	3 min	1x
Denaturierung	95 °C	50 s	
Annealing	58 °C	1 min	38x
Elongation	72 °C	1 min/kbp	
finale Elongation	72 °C	3 min/kbp	1x
Lagerung/Kühlung	8 °C	∞	

Dem Start des ersten PCR-Zyklus war eine 2-minütige initiale Denaturierung der DNA bei 98 °C vorgeschaltet. In der ersten Phase des Zyklus wurde das Template auf 95 °C erhitzt, um die komplementären Doppelstränge voneinander zu trennen. Beim darauffolgenden Annealing wurde die Temperatur für 1 Minute (min) auf 54-64 °C gesenkt, damit sich die Primer an die Einzelstränge des DNA-Templates anlagern konnten. Es wurde bei längeren Primersequenzen sowie bei Primern mit einem größeren GC-Gehalt eine höhere Annealingtemperatur gewählt. Da die Taq-Polymerase nur in 5'-3'-Richtung synthetisiert, wurde ein Forward-Primer am 5'-Ende der Zielsequenz und ein Reverse-Primer am 3'-Ende des komplementären Strangs benötigt. Im Anschluss wurden die PCR-Ansätze auf 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhitzt. Diese synthetisierte durch Anhängen von Desoxyribonukleotiden an das freie 3'-Hydroxy-Ende der Primer einen zum Vorlagenstrang komplementären Tochterstrang. Dieser Schritt wird Elongation genannt. Hierfür wurde eine Dauer von 1 min pro Kilobasenpaar (kbp) veranschlagt. Nach der Elongation wurde die DNA erneut erhitzt und der Zyklus begann von vorne. Insgesamt wurde der gesamte PCR-Zyklus 30-38-mal wiederholt. Da bei jedem Zyklus pro Vorlagenstrang ein Tochterstrang synthetisiert wurde, der in der nächsten Runde ebenfalls als Vorlagenstrang diente, vervielfältigte sich die Zielsequenz nahezu exponentiell. Nach dem letzten Zyklus folgte die finale Elongationsphase, die dreimal so lang wie die normale Elongation andauerte, um eine Vervollständigung der Tochterstränge zu gewährleisten. Nach der erfolgten Polymerasekettenreaktion wurde der Cycler zur Aufbewahrung der DNA auf 8 °C gekühlt. Für die endgültige Lagerung wurde die DNA bei baldiger Weiterverarbeitung bei 4 °C, ansonsten bei -20 °C aufbewahrt.

5.1.2 Selektion korrekt klonierter Plasmide mittels Kolonie-PCR

(HOFMANN, BRIAN, 1991; SATHE et al., 1991)

Um festzustellen, ob eine Bakterienkolonie ein korrekt ligiertes Plasmid enthält, wurde diese Kolonie mittels PCR getestet. Dazu wurde ein PCR-Mastermix ohne DNA-Template zusammenpipettiert. Anstelle eines regulären Templates wurde jedem Einzelansatz eine Bakterienkolonie als Template zugefügt. Pro Kolonie wurde ein halber regulärer PCR-Ansatz (siehe Tabelle 21) eingesetzt, zudem wurde sowohl eine Positivkontrolle mit leerem pMIR-RNL-TK-Vektor als auch eine Negativkontrolle ohne Template mitgeführt. Im Ansatz wurden pMIR-RNL-TK-Primer verwendet, wobei der Forward-Primer 111 bp upstream und der Reverse-Primer 107 bp downstream der MCS bindet. Der Mastermix wurde auf PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Die Kolonien wurden nummeriert, jeweils mit einem Zahnstocher von der Agarplatte gepickt, in ein Reaktionsgefäß und abschließend zusätzlich auf den Nährboden einer neuen ampicillinhaltigen Agarplatte, der sogenannten Masterplatte, überführt. Bei der initialen Denaturierung innerhalb des ersten Zyklus der Polymerasekettenreaktion wurden die bakterielle Zellwand zerstört und die prokaryotische DNA freigesetzt. In der anschließenden PCR wurde die MCS samt Insert vervielfältigt. In Tabelle 22 sind die Temperaturschritte des Thermocyclers dargestellt.

Tabelle 22: Thermocyclerprogramm zur Durchführung einer Kolonie-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer und Anzahl Wiederholungen
initiale Denaturierung	95 °C	3 min 1x
Denaturierung	95 °C	50 s
Annealing	57 °C	1 min 25x
Elongation	72 °C	1 min/kbp
finale Elongation	72 °C	3 min/kbp 1x
Lagerung/Kühlung	8 °C	∞

Bei der darauffolgenden Gelelektrophorese konnte aufgrund der Primerpositionen für einen korrekt kloniertes Plasmid eine Bande mit der Größe des Inserts plus 250 bp erwartet werden. Auf Grundlage der Ergebnisse der Gelelektrophorese der Kolonie-PCR wurden positiv getestete Bakterienkolonien ausgewählt und diese von der Masterplatte in 100 ml flüssiges,

ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und über Nacht im Brutschrank unter Schütteln bei 37 °C inkubiert.

5.1.3 Mutagenese der Zielsequenz

(HUTCHISON et al., 1978)

Für den Nachweis, dass eine posttranskriptionelle Repression auf der Bindung der miRNA an die vorausgesagte miRNA-Bindestellen in der Wildtyp(wt)-3'UTR basiert, wurde die potenzielle Bindestelle bei positiv getesteten Zielgenen durch die Schnittstelle eines Restriktionsenzym mithilfe einer *overlap extension*-PCR (OE-PCR) ersetzt. Für die OE-PCR wurden zwei komplementäre, circa 45 bp lange Primer synthetisiert, die über der miRNA-Bindestelle lagen und bei denen die Sequenz der jeweiligen zu mutierenden miRNA-Bindestelle durch die Schnittstelle einer Restriktionsendonuklease ausgetauscht worden ist. Es wurden zwei PCRs mit jeweils einem Klonierungs- und einem Mutageneseprimer durchgeführt, sodass zwei sich teilweise überlappende PCR-Produkte gewonnen werden konnten. Diese komplementären Überhänge wurden bei einer dritten Polymerasekettenreaktion, die nur mit den Klonierungsprimern durchgeführt wurde, hybridisiert, sodass dieses PCR-Produkt mit Ausnahme der nun mutierten Bindestelle dem ursprünglichen 3'UTR-Klonierungsprodukt entsprach. In Abbildung 6 ist der Ablauf der OE-PCR schematisch abgebildet.

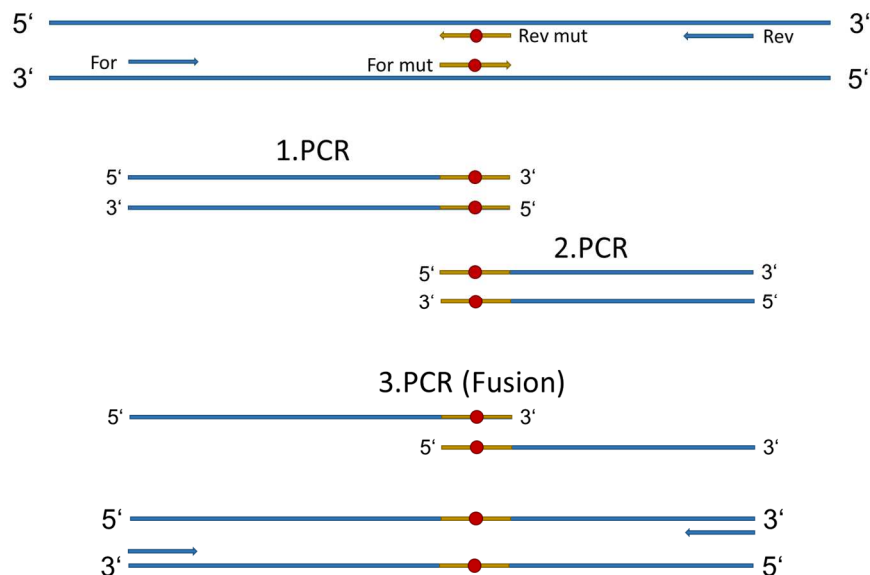


Abbildung 6: OE-PCR. Die zielgerichtete Mutation von Oligonukleotidsequenzen erfolgte mittels OE-PCR. Es wurden zwei PCRs durchgeführt, die jeweils einen Klonierungs- und einen Mutagenese-Primer enthielten, der eine Veränderung der Basensequenz im Vergleich zum Vorlagenstrang aufwies. Die PCR-Produkte der beiden Ansätze waren an der Position der Mutation komplementär zueinander. Die beiden DNA-Produkte wurden in einer dritten PCR eingesetzt, in der ausschließlich Klonierungsprimere zugegeben wurden und die die Nukleotidstränge hybridisierten. Das hierbei entstandene PCR-Produkt war mit Ausnahme der mutierten Sequenz identisch zum Vorlagenstrang. Abkürzungen: For=Forward, Rev=Reverse

5.1.4 Agarosegelelektrophorese

(AAIJ, BORST, 1972)

Zur Überprüfung des PCR-Erfolgs und zur Isolation der gewünschten Nukleotidsequenzen wurde im Anschluss an die PCR eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit 5 Mikrolitern (μl) *gel loading dye, purple* (6x) der New England BioLabs GmbH versetzt. Das Agarosegel wurde in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Kammer gelegt und die Geltaschen entweder mit den Proben, oder einem DNA Molekulargewichtsstandard, der aus verschiedenen Nukleotidsequenzen bekannter Größen besteht und als Marker fungierte, befüllt. An die Kammer wurde ein elektrisches Feld angelegt, in dem die durch die Phosphatreste der Nukleotide (Phosphatrückgrat) negativ geladene DNA im Gel zur Anode wanderte. Kleine Nukleotidsequenzen bewegten sich im Gel weiter als große, da das Agarosegel als „Molekularsieb“ diente, welches von kleineren Molekülen leichter durchwandert wird. Da die Nukleotidlänge der jeweiligen Markerbanden bekannt ist, konnte im Vergleich die Größe des PCR-Produkts bestimmt werden. Die Nukleotidbanden wurden mit ultraviolettem(UV)-Licht sichtbar gemacht. Sollte nur ein Nachweis einer Bande erfolgen, wurde kurzwelliges UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 Nanometern (nm) verwendet. Da ein so kurzwelliges Licht DNA-Strangbrüche induziert, wurde zur DNA-Isolation UV-Licht mit einer Wellenlänge von 365 nm eingesetzt und die derart sichtbar gemachte Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

5.1.4.1 Gießen eines Agarosegels

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 6,75 g Agarose mit 450 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, um die Agarose zu lösen. Dieses Mischverhältnis wurde hierbei aufgrund der Größe der aufzutrennenden DNA gewählt, da das Molekularsieb bei einem höheren Agaroseanteil „feiner“ wird und sich dadurch zur Auftrennung kürzerer Nukleotidsequenzen eignet. Mit der noch verflüssigten Agarose wurde eine Gießvorrichtung abgedichtet. In die Vorrichtung wurden Käbme platziert, welche im Gel die Taschen formten. Die restliche Lösung wurde 30-40 min unter Rühren abgekühlt. Im Anschluss wurden 25 μl Ethidiumbromid hinzupipetiert und die Lösung in die Form gegossen. Ethidiumbromid ist ein DNA-Interkalator, durch den DNA-Proben unter ultraviolettem Licht fluoreszieren. Nach dem Aushärten des Gels kann dieses bis zu einem Monat mit Klarsichtfolie bedeckt bei 8 °C aufbewahrt werden.

5.1.5 DNA-Aufreinigung mit NucleoSpin

Um DNA aus einem Gel oder einem Restriktionsverdau zu extrahieren, wurde eine Säulenaufreinigung, basierend auf dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie, mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit der Firma Machery-Nagel durchgeführt. Hierbei wurde das Gelstück bei 50 °C in 400 µl NT1-Puffer geschmolzen, bei einem Verdau wurde die Probe mit 40 µl NT1 gemischt. Die Lösung wurde auf eine Säule pipettiert und 1 min bei 13.000 Umdrehungen pro Minute (rpm, *revolutions per minute*) zentrifugiert. In diesem Schritt lagerte sich die DNA an die silicahaltige Säule an, der Überstand konnte verworfen werden. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit 650 µl ethanolhaltigem NT3 Puffer gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Die Säule wurde 2 min bei 13.000 rpm getrocknet, zum Eluieren auf ein frisches Eppendorfgefäß positioniert und 20 µl nukleasefreies ddH₂O auf die Säulenmembran gegeben. Es erfolgte eine 2-minütige Inkubation, danach wurde die Säule für 2 min zentrifugiert. Das Eluat bestand aus den in Wasser gelösten DNA-Fragmenten. Um Lösungsmittelrückstände zu entfernen, wurde die Probe in einem SpeedVac-Konzentrator eingedampft. Zum Schluss wurde die getrocknete DNA in Wasser gelöst und bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C gelagert.

5.1.6 Enzymatische Modifikation der DNA

5.1.6.1 Verdau durch Restriktionsendonukleasen

(NATHANS, SMITH, 1975)

Restriktionsendonukleasen sind natürlich vorkommende Enzyme, die Mikroorganismen vor Fremd-DNA schützen, indem sie abweichende Methylierungsmuster in der DNA erkennen und diese schneiden. In der Gentechnik werden Klasse II-DNA-Restriktionsenzyme verwendet. Enzymspezifisch schneiden diese den Doppelstrang an einer palindromischen Erkennungsstelle entweder linear, wobei sogenannte *blunt ends* entstehen oder sie schneiden die Stränge versetzt, sodass an den Schnitträndern überhängende Einzelstränge (*sticky ends*) vorliegen. Diese einzelsträngigen Überhänge wurden genutzt, um ein DNA-Fragment gerichtet in ein Plasmid einfügen zu können. Hierfür wurden das Plasmid und die DNA-Sequenz mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten, wodurch die überhängenden Einzelstränge hybridisieren konnten. Ein Insert wurde mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten, damit zwei verschiedene Enden entstanden und die Sequenz nur in einer Richtung in das zuvor linearisierte Plasmid ligiert werden konnte. In Tabelle 23 ist exemplarisch ein Standard-Restriktionsansatz dargestellt.

Tabelle 23: Standard-Restriktionsverdau.

Reagenz	Endkonzentration	eingesetztes Volumen
Puffer	1×	2 µl
DNA		16 µl
Enzym 1	20 U	1 µl
Enzym 2	20 U	1 µl

Zur Klonierung wurden Enzyme gewählt, durch deren Verdau *sticky ends* entstehen, da diese besser miteinander ligieren. Aufgrund ihrer hohen Effizienz wurden für den Restriktionsverdau bevorzugt die Restriktionsendonukleasen *Spe I* und *Sac I* verwendet. Alternativ wurde *NgoM IV* eingesetzt, welches jedoch weniger effizient schneidet. Bei dem Verdau eines Vektors wurde dem Ansatz zusätzlich RAP zugegeben, um die 5'-Enden zu dephosphorylieren, sodass das Plasmid bei der Ligation nicht mit sich selbst ligieren und so rezirkularisieren konnte. In Tabelle 24 ist die Zusammensetzung eines pMIR-RNL-TK-Restriktionsverdau abgebildet.

Tabelle 24: Zusammensetzung eines pMIR-Restriktionsverdau.

Reagenz	Endkonzentration/Endmenge	eingesetztes Volumen
10× Cut Smart-Puffer	1×	2 µl
pMIR-RNL-TK-DNA	2000 ng	2 µl
RAP	1 U	1 µl
Enzym 1	20 U	1 µl
Enzym 2	20 U	1 µl
nukleasefreies ddH ₂ O		13 µl

5.1.6.2 Ligation

(LEHMAN, 1974; SGARAMELLA et al., 1970)

Das Verbinden zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente mit komplementären Enden wird als Ligation bezeichnet. Katalysiert wurde die Ligation durch die T4-Polymerase, welche aus mit T4-Bakteriophagen infizierten *E. coli* gewonnen wurde (SGARAMELLA et al., 1970). Die Phosphatgruppe am 5'-Ende eines Nukleotids reagiert unter Adenosintriphosphat (ATP)-

Verbrauch mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase mit dem 3'-Hydroxyende des benachbarten Nukleotids zu einer Phosphodiesterbindung. In Tabelle 25 ist dieser Standard-Ligationsansatz abgebildet.

Tabelle 25: Standard-Ligationsansatz.

Reagenz	eingesetztes Volumen
10× T4-DNA-Ligase-Puffer	1 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
Vektor-DNA	1 µl
Insert-DNA	7 µl

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um zu prüfen, ob ein neu verdauter Vektor erfolgreich dephosphoryliert werden konnte, wurde als Negativkontrolle ein Ligationsansatz ohne DNA-Insert mitgeführt und dieser ebenfalls in *E. coli* transformiert und ausplattiert. Es sollten keine Kolonien wachsen, da nur zirkuläre Plasmide transkribiert werden können und somit das Ampicillinresistenzgen nicht exprimiert werden kann.

5.1.7 Konzentrationsmessung mittels Spektralphotometer

(VISCHER, CHARGAFF, 1948)

Das Nanodrop™ 2000 Spektralphotometer kann die Absorption von Licht bei verschiedenen Wellenlängen messen. DNA und RNA absorbieren Licht einer Wellenlänge von 260 nm, das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm (ARNEMANN, 2019; PACE et al., 1995). Die Absorption verhält sich direkt proportional zur Stoffkonzentration der DNA, die somit unter Anwendung des Lambert-Beerschem-Gesetz berechnet werden kann. Durch Bildung eines Quotienten aus den Absorptionen bei 260 und 280 nm kann die Verunreinigung der DNA, z. B. durch Proteine, gemessen werden. Bei reiner DNA sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen (ARNEMANN, 2019). Zur Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop™ wurde 1 µl der Probe auf den Sensor des Gerätes aufgetragen. Nach Bestimmung der Konzentration wurde die DNA unter Anwendung der nachstehenden Formel mit nukleasefreiem ddH₂O auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2.$$

5.2 prokaryotische Zellkultur

5.2.1 Kultivierung von Bakterien

Bei den im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimenten wurden Bakterien des kompetent gemachten *E. coli*-Stammes NEB®5-alpha der New England Biolabs GmbH eingesetzt. Diese wurden bei -70 °C gelagert und zur Kultivierung auf Agarböden ausplattiert oder in 100 ml flüssigem LB-Medium angezogen. Sowohl die Platten als auch das Medium wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die kultivierten Agarplatten konnten für einige Wochen bei 4 °C gelagert werden. Die Flüssigkulturen wurden dauerhaft in DMSO-Stocks gelagert, indem 500 µl Kultur mit 100 µl DMSO gemischt und bei -70 °C eingefroren wurden. Das DMSO verhinderte hierbei die Bildung von Eiskristallen, welche die Bakterien zerstört hätten.

5.2.2 Transformation von *E. coli* (Stamm NEB®5-alpha)

(AVERY et al., 1944; COHEN et al., 1972; GRIFFITH, 1966)

Die Transformation hat zum Ziel, rekombinante Plasmide in *E. coli*-Bakterien einzubringen. Dafür muss die Zellmembran der Bakterien durchlässig gemacht werden. Dies kann durch Elektroporation oder, wie in dieser Arbeit, durch einen Hitzeschock erzielt werden. Die Bakterien, die zur Transformation verwendet werden, müssen in der Lage sein, DNA aufzunehmen. Diese Eigenschaft wird als Kompetenz bezeichnet. Über eine natürliche Kompetenz verfügen nur wenige Bakterien, unter anderem *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* (DUBNAU, 1999). *E. coli*-Bakterien müssen daher erst kompetent gemacht werden. Dies gelingt unter anderem durch hohe Kalziumkonzentrationen (MANDEL, HIGA, 1970). In dieser Arbeit wurde der bereits kompetent gemachte *E. coli* Stamm NEB®5-alpha verwendet.

Für die Transformation wurden 10 µl Bakterien mit 1 µl Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit konnte sich die DNA an die Zellmembran anlagern. Im nächsten Schritt erfolgte der eigentliche Hitzeschock: Der Ansatz wurde für exakt 30 Sekunden (s) in einem 42 °C warmen Wasserbad inkubiert. Dieser plötzliche Temperaturanstieg führte zu einer Permeabilisierung der Bakterienmembran. Nach dem Schock wurde die Probe kurz auf Eis gestellt und 100 µl SOC Medium zugeführt, um ein Absterben der Bakterien durch zu lang andauernden Zellstress zu verhindern. Die *E. coli*-Suspension wurde eine Stunde (h) bei 37 °C und 600 rpm in einem Thermomixer inkubiert und auf ampicillinhaltige Agarböden ausplattiert, welche über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert wurden. Da der naive *E. coli*-Stamm ampicillinsensibel ist, das eingebrachte Plasmid jedoch ein Ampicillinresistenzgen enthält, konnten nur die erfolgreich transformierten Bakterien Kolonien auf den ampicillinhaltigen Nährböden bilden.

5.2.3 Ligation über pGEM®T-Easy und Blau-Weiß-Selektion

(KOENEN et al., 1982)

Erwies sich eine Klonierung als schwierig, wurde das PCR-Produkt, ohne zuvor verdaut zu werden, in den pGEM®T-Easy Vektor ligiert. Dies ist möglich, da das pGEM-Plasmid über eine Poly(T)-MCS verfügt und bei PCR-Produkten bereits ein Poly(A)-Schwanz angehängt ist. Daher ligiert der pGEM-Vektor mit hoher Effizienz bereits mit kleinsten Mengen PCR-Produkt. Diese Vektoren wurden im Rahmen einer Transformation in *E. coli* eingebracht. Mittels Blau-Weiß-Selektion wurden die Bakterien mit korrekt ligiertem pGEM-Plasmid identifiziert und in LB-Medium inokuliert. Der pGEM-Ligationsansatz wurde auf einer mit Isopropylthiogalactosid (IPTG) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-GAL) inokulierten Agarplatte ausplattiert, wodurch eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt wurde: Der eingesetzte pGEM-Vektor verfügt neben dem Ampicillinresistenzgen ein β -Galaktosidasegen (*lacZ*-Gen) mit integrierter MCS. Das Enzym β -Galaktosidase katalysiert unter Anwesenheit von IPTG die Umwandlung des farblosen Substrats X-Gal in einen blauen Farbstoff. Daraus lässt sich folgern, dass blaue Kolonien zwar einen Vektor aufgenommen haben, dieser jedoch kein Insert enthalten kann, da für die Farbveränderung das *LacZ*-Gen intakt sein muss. Im Gegensatz hierzu verfügen weiße Kolonien über einen Vektor mit Insert, da die eingefügte DNA das Leseraster des *LacZ*-Gens zerstört und in der Folge X-Gal nicht umgewandelt werden kann. Bakterien, die kein Plasmid aufgenommen haben, wachsen auf dem ampicillinhaltigen LB-Boden nicht.

Auf diesem Weg konnten große Mengen an korrekt kloniertem pGEM®T-Easy-Vektor gewonnen werden, welcher im Anschluss verdaut wurde, um große Mengen der gewünschten Sequenz zu erhalten. Für eine erneute Ligation in pMIR-RNL-TK war somit mehr Vorlagen-DNA vorhanden, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit, positive Klone zu erhalten, erhöhte. Der pGEM®T-Easy-Ligationsansatz ist Tabelle 26 zu entnehmen.

Tabelle 26: Zusammensetzung eines pGEM-Ligationsansatzes.

Reagenz	eingesetztes Volumen
2× Rapid Ligation-Puffer	5 μ l
pGEM®T-Easy-Vektor	1 μ l
T4-Ligase	1 μ l
3'UTR-PCR-Produkt	3 μ l

5.2.4 Plasmidaufreinigung durch NucleoBond

(ELKIN et al., 2015; STRIEGEL, 2015)

Die Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus bakteriellen Flüssigkulturen erfolgte mit dem auf Ionen-Austausch-Chromatographie basierten NucleoBond Kit der Firma Machery Nagel. Zunächst wurden die Bakterien durch 15-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und Raumtemperatur (RT) pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 4 ml RNase A-haltigem S1-Puffer resuspendiert. Danach wurden 4 ml S2-Puffer zugesetzt, gevortext und 4 min bei RT inkubiert. Der S2-Puffer enthielt SDS, welches die Zellwand der Bakterien lysierte, sowie NaOH zur Denaturierung von Proteinen und DNA. Abgestoppt wurden diese Reaktionen durch Zugabe von 4 ml S3-Puffer. Im nächsten Schritt wurde die Suspension durch Invertieren gemischt und ebenfalls 4 min auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubationszeit rehybridisierte die kleine Plasmid-DNA, während die große, chromosomale DNA denaturiert blieb und zusammen mit den Proteinen ausfiel. Im nächsten Schritt wurde die Suspension 25 min bei RT zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen: Eine obere, dünne Haut, bestehend aus Zellresten, mittig die Plasmide in Lösung, am Boden des Falcons sammelte sich die abgesetzte denaturierte Zelldebris. Die mittlere, flüssige Schicht wurde auf die mit 2,5 ml Equilibrationspuffer präparierten Säulen gegossen. Hierbei führten die in der Lösung vorliegenden Salz- und pH-Bedingungen zum Binden der negativ geladenen Plasmide an das Säulenmaterial. Zur vollständigen Entfernung von RNA, Proteinen und Salzen wurde die Membran zweimal mit je 5 ml N2-Waschpuffer gewaschen, bevor die Säule auf ein frisches Falcon gesetzt und die Plasmide durch negativ geladene Ionen, die im N5-Puffer enthalten sind, mit 5 ml Elutionspuffer ausgewaschen wurden. Zur Fällung der Plasmide wurden 3,6 ml 100 %-iges Isopropanol zu dem Eluat pipettiert, gevortext, und die Lösung danach für mindestens eine Stunde bei 4 °C und 5.000 rpm zentrifugiert. Das Isopropanol fällte die Plasmide durch Senkung der Löslichkeitsgrenze, unterstützt von der niedrigen Temperatur bei der Zentrifugation. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet wurde mit 2 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und weitere 10 min mit 5.000 rpm bei RT zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol verworfen und verbliebene Reste mit Whatman-Paper möglichst vollständig entfernt. Abschließend wurde das Plasmidpellet im 50 °C warmen Wasserbad in 50 µl H₂O gelöst.

5.3 eukaryotische Zellkultur

5.3.1 HEK293T

5.3.1.1 Kultivierung

Zur Durchführung der Dual-Luciferase-Assays wurde die adhärent auf einer Oberfläche wachsende HEK293T-Zelllinie verwendet. Diese aus humanen embryonalen Nierenzellen

stammende Zelllinie wurde in mit DMSO versetztem Kryomedium bei -176 °C in Flüssigstickstofftanks gelagert und bei Bedarf aufgetaut. Kultiviert wurde die Zelllinie in Zellkulturflaschen mit einer Oberfläche von 75 cm², als Nährmedium wurde DMEM, versetzt mit 10 % FKS und 1 % Pen/Strep, verwendet. Die Zellkulturflaschen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) inkubiert.

5.3.1.2 Splitten

Die HEK293T-Kulturen wurden montags und freitags in einem Verhältnis von 1:20 bzw. 1:30 gesplittet. Dabei wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 1 ml Trypsin, einer Protease, vorsichtig gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin abgelöst, hierfür wurde die Zellkulturflasche für einige Minuten im Brutschrank inkubiert. In der Zwischenzeit wurden je 15 ml DMEM-Medium in neue Zellkulturflaschen aliquotiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 9 ml Zellkulturmedium in die Zellkulturflasche mit der Zell-Trypsin-Suspension hinzupipettiert und die Zellen zur Vereinzelung durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Von der Zellsuspension wurde der entsprechende Anteil in die neuen Flaschen pipettiert, vorsichtig gemischt und dann im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden bis einschließlich Passage 20 gesplittet und für Versuche verwendet, danach wurden sie verworfen.

5.3.2 Primäre Zellen

Die Isolation, Kultivierung und Transfektion der primären Blutzellen sowie die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Durchflusszytometriemessungen und ELISAs wurden in Zusammenarbeit mit der Nachwuchsgruppe Virologie/Immunologie am Zentrum für Human- und Molekularbiologie der Universitätsklinikums des Saarlandes unter der Leitung von Dr. rer. nat. Barbara Walch-Rückheim durchgeführt.

5.3.2.1 Isolation von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)

(NOBLE, CUTTS, 1967)

Die Isolation der PBMCs, zu denen unter anderem Monozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen gezählt werden, erfolgte durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll. Hierfür wurden zunächst 25-30 ml frisches Vollblut in ein Falcon überführt und mit DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*) auf 35 ml aufgefüllt. In einem weiteren Falcon wurden 13 ml FicoLite®-

H vorgelegt und vorsichtig mit dem Blut überschichtet, da für das Aufbereiten der PBMCs der Erhalt der zwei Phasen essenziell ist. Durch 25-minütiges Zentrifugieren bei 1.800 rpm ohne Bremse bildete sich ein Dichtegradient aus. Bei FicoLite®-H handelt es sich um eine Trennlösung, basierend auf Ficoll, einem Saccharose-Polymer. Ficoll ist weniger dicht als Erythrozyten und die meisten Granulozyten, die die unterste Schicht des Gradienten bilden. Die PBMCs bilden eine trübe Wolke direkt über dem FicoLite®-H, die oberste Lage bildet das Blutserum. Im nächsten Schritt wurden PBMCs mit Teilen des Serums, jedoch ohne Ficoll, da dieses giftig für die Zellen ist, abgenommen und in ein weiteres Falcon überführt. Dieses wurde zur weiteren Aufreinigung mit DPBS aufgefüllt und bei 1.600 rpm für 6 min abzentrifugiert. Die zellulären Bestandteile pelletierten am Boden des Falcons, der Überstand wurde verworfen. Daraufhin wurde das Pellet noch zweimal durch Lösen in 10 ml DPBS und erneutem Abfugen bei 1.600 rpm für 6 min gewaschen und auf diesem Weg von Serumresten und Thrombozyten gereinigt. Zudem leitete das DPBS eine hypotone Lyse der verbliebenen Erythrozyten ein. Zum Schluss wurden die aufgereinigten PBMCs gezählt. Die gewonnenen PBMCs bildeten die Grundlage für weitere Versuche mit den einzelnen Blutzellsubtypen.

5.3.2.2 Isolierung und Polarisierung von M1-Makrophagen aus Monozyten mit M1-Macrophage-Generation-Medium DXF

(PROMOCELL, 2020)

Zur Isolierung und Polarisierung der Monozyten wurde das M1-Macrophage-Generation-Medium DXF von PromoCell verwendet und entsprechend dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Hierbei wurden die gezählten PBMCs durch 6-minütiges Zentrifugieren bei 1.600 rpm pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Monocyte-Attachment-Medium pro 10^8 Zellen aufgenommen und mit einer Dichte von 10^6 PBMCs/cm² in eine Zellkulturschale ausgesät. Nach einer 90-minütigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂, während der sich die Monozyten an den Boden der Schale angeheftet hatten, wurde die Schale dreimal mit je 5 ml Monocyte-Attachment-Medium kräftig gespült, um sämtliche nichthaftende Zellen zu entfernen. Danach wurden 5 ml M1-Macrophage-Generation-Medium über die Zellen gegeben. Das Medium enthält Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) und induziert die Polarisierung der Monozyten zu M1-Makrophagen. Nach einer sechstägigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden 0,1 ml M1-Macrophage-Generation-Medium pro cm² nachgelegt. An Tag 9 wurde das M1-Macrophage-Generation-Medium ausgetauscht. Hierfür wurden die im alten Medium suspendierten Zellen durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 1.600 rpm pelletiert, mit einem Teil des neuen Mediums resuspendiert und zu den adhären Zellen gegeben. An Tag 10 erfolgte die Kontrolle der erfolgreichen M1-Makrophagen-Polarisierung

mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wurden die Zellen auf die Expression von CD14, CD68, CD80 sowie CD163 untersucht. Im Anschluss an die Polarisierung erfolgte die Transfektion mit ANC oder miR-34a-5p-Mimic.

5.3.2.3 Aktivierung der Makrophagen

Die Aktivierung der Makrophagen erfolgte 48 h nach der Transfektion. Hierbei wurden 10 ng/ml LPS sowie 50 ng/ml IFN- γ zu den Makrophagen gegeben und diese für weitere 4 h im Brutschrank inkubiert.

5.3.2.4 Isolierung von CD4⁺-T-Zellen über MicroBeads

Die Isolation von CD4⁺-T-Zellen über MicroBeads erfolgte unter Verwendung des CD4 T-Cell Isolation Kits human von MACs Miltenyi Biotec über eine negative Selektion. Nach der Zählung wurden die PBMCs für 6 min bei 1.600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 40 μ l Puffer, bestehend aus DPBS, welches mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA versetzt war, je 10^7 Zellen resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden 10 μ l CD4-T-Cell-Biotin-Antibody-Cocktail aus dem Kit zu den PBMCs hinzupipettiert, mit diesen vorsichtig vermischt und die Zellen für 5 min bei 4 °C inkubiert. Der Cocktail enthält Biotin-konjugierte Antikörper gegen CD-Oberflächenmarker aller nicht-CD4-positiven Blutzellen (CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ und Glycophorin A). Nach der Inkubationszeit wurden zunächst weitere 30 μ l Puffer und danach 20 μ l CD4-T-Cell MicroBead Cocktail pro 10^7 Zellen hinzupipettiert. Die MicroBeads banden an die Antikörper, die wiederum an die CD4⁺-Zellen banden. Während die PBMCs weitere 10 min bei 4 °C inkubierten, wurde die Säule magnetisiert und mit 3 ml Puffer gespült. Da die MicroBeads an die CD4⁺-Zellen banden, blieben diese an der Säule hängen, sodass sich im Durchfluss ausschließlich die CD4⁺-T-Zellen befanden. Im abschließenden Schritt wurde die Säule einmalig mit 3 ml Puffer gewaschen, um zurückgebliebene, nichtadhärente CD4⁺-T-Zellen vollständig aus der Säule zu gewinnen. Der Durchfluss wurde durch 10-minütiges Abzentrifugieren bei 1.600 rpm pelletiert und der flüssige Überstand verworfen. Die aufgereinigten CD4⁺-T-Zellen wurden in 12-Well-Zellkulturplatten mit einer Dichte von 10^6 Zellen pro Kavität ausgesät und konnten im Anschluss transfiziert werden.

5.3.2.5 Stimulierung der CD4⁺-T-Zellen

Die Stimulierung der CD4⁺-T-Zellen erfolgte 24 h nach der Transfektion mit HiPerFect™ durch PMA/Ionomycin. Hierbei wurden 5 ng PMA sowie 500 ng Ionomycin je ml T-Zell-Flüssigkultur

nach Herstellerangaben in LPS-freiem RPMI verdünnt und zu den Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 24 h im Brutschrank inkubiert.

5.3.3 Zellzahlbestimmung mit dem LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter

Die Bestimmung der HEK293T-Zellzahlen fand mit dem LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter von Logos Biosystems statt. Hierfür wurde in einer Doppelbestimmung je 10 µl Zellsuspension in die Kammern einer zum System gehörenden Zellzählkammer aufgetragen und im *bright field cell counting*-Modus ohne Färbung mit Trypanblau gemessen. Der Mittelwert wurde berechnet und als Zellzahl/ml verwendet.

5.3.4 Transfektionstechniken

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde Fremd-DNA oder miRNA in Zellen mit Transfektionsreagenzien der Firma QIAGEN eingebracht. Zur Transfektion der HEK293T-Zellen mit Plasmid-DNA wurde PolyFect™ eingesetzt, die M1-Makrophagen sowie die CD4⁺-T-Zellen wurden mit synthetischer miRNA oder einer Kontrolle mittels HiPerFect™-Transfektionsreagenz der Firma QIAGEN transfiziert. Es wurde ein miScript miR-34a-5p-Mimic oder eine AllStars *Negative Control* siRNA (ANC) eingebracht. Das miR-34a-5p-Mimic ist eine synthetisch hergestellte, doppelsträngige RNA, die die Funktionen der echten miR-34a-5p nachahmt (QIAGEN, 2013d). Bei der ANC handelt es sich um eine nichtkodierende RNA, die wie eine miRNA in den RISC eingebaut wird, von der jedoch keine Komplementarität zu menschlicher mRNA bekannt ist (QIAGEN, 2013c). Sie wurde bei Transfektionen als Negativkontrolle der miR-34a-5p eingesetzt.

5.3.4.1 Transfektion von eukaryotischen HEK293T-Zellen mit PolyFect™

Zur Transfektion von eukaryotischen HEK293T-Zellen für Dual-Luciferase-Assays wurde das PolyFect™-Transfektionsreagens der Firma QIAGEN verwendet (siehe Abschnitt 5.4). Merkmal dieses Transfektionsreagens ist eine hohe Transfektionseffizienz und geringe Zytotoxizität bei der Transfektion von HEK293T-Zellen. Das PolyFect™-Transfektionsreagens besteht aus Dendrimeren, an deren positiv geladene Aminogruppen die negativ geladene DNA binden kann. Insgesamt bleiben die Dendrimere jedoch positiv geladen und können daher an negativ geladene Oberflächenrezeptoren der zu transfizierenden Zellen binden und über Endozytose ins Zellinnere aufgenommen werden (QIAGEN, 2013b).

5.3.4.2 Transfektion von CD4⁺-T-Zellen und M1-Makrophagen mit HiPerFect™

Die transiente Transfektion von CD4⁺-T-Zellen bzw. differenzierten M1-Makrophagen wurde mithilfe des HiPerFect™-Transfektionsreagens der Firma QIAGEN durchgeführt. HiPerFect™ besteht aus positiv geladenen und neutralen Fetten. Durch die positive Ladung bilden die Fette Komplexe mit dem negativ geladenen RNA-Phosphatrückgrat und lagern sich an die ebenfalls negativ geladene Zellmembran an, woraufhin die Komplexe endozytiert werden können (QIAGEN, 2013a). Zur Transfektion wurden 10⁶ CD4⁺-T-Zellen bzw. 1,5×10⁶ M1-Makrophagen pro Kavität einer 12-Well-Zellkulturplatte ausgesät, welche bereits 1 ml RPMI-Medium mit 10 % FKS und 1 % Pen/Strep enthielt. Danach wurden die Zellen entweder mit der Negativkontrolle ANC oder dem synthetischen miR-34a-5p-Mimic transfiziert.

Für den jeweiligen Transfektionsansatz wurden 1,2 µl (= 20 µmol) der entsprechenden RNA in 100 µl antibiotikafreiem RPMI-Medium verdünnt. Anschließend wurden 12 µl HiPerFect™ hinzupipettiert, der Transfektionsansatz wurde gevortext sowie abzentrifugiert und für 5 min bei RT inkubiert, um die Anlagerung der RNA an die Lipide zu gewährleisten. Im letzten Schritt wurde der Ansatz tröpfchenweise zu den Zellen hinzupipettiert.

5.3.5 Durchflusszytometrie

(DITTRICH, GOHDE, 1969; HULETT et al., 1969)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse suspendierter Zellen, welches unter anderem der Bestimmung von Zellgröße und -granularität dient. Dies ermöglicht die Unterscheidung und Quantifizierung verschiedener Blutzellsubtypen einer Blutprobe. Zudem können über fluoreszenzgekoppelte Antikörper zelluläre Proteine gefärbt und quantifiziert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FACS-Messungen sowie deren Auswertungen wurden in Zusammenarbeit mit der Nachwuchsgruppe Virologie/Immunologie am Zentrum für Human- und Molekularbiologie der Universitätsklinikums des Saarlandes unter der Leitung von Dr. rer. nat. Barbara Walch-Rückheim durchgeführt.

5.3.5.1 Durchflusszytometrie-Färbung

Zur Quantifizierung der CXCR3-Expression auf mit miR-34a-5p transfizierten, stimulierten CD4⁺-T-Zellen wurden diese Chemokinrezeptoren mittels fluoreszenzgekoppelter, spezifischer Antikörper gefärbt und durch eine *fluorescence-activated cell sorting*(FACS)-Analyse nachgewiesen. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl der ANC bzw. miR-34a-5p transfizierten CD4⁺-T-Zellen bestimmt und für jeden zu färbenden Ansatz 10⁵ Zellen in FACS-Röhrchen überführt. Es wurden pro Transfektionsansatz zwei Proben analysiert. Ein Teil des jeweiligen Ansatzes wurde mit einem APC-A markierten anti-CXCR3-Antikörper gefärbt, der andere mit einer Isotyp-Kontrolle, einem unspezifisch bindenden Antikörper desselben Isotyps, welcher ebenfalls APC-A markiert war. Beide Ansätze wurden zudem mit einem Alexa Fluor 488-A markierten anti-CD4-Antikörper versetzt. Die FACS-Röhrchen wurden bei 1.600 rpm für 10 min zentrifugiert und der flüssige Überstand verworfen. Sämtliche Oberflächenantigene der transfizierten CD4⁺-T-Zellen wurden mit 2 ml eines Standardpuffers, bestehend aus DPBS mit 2 % FKS, geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Daraufhin wurden entsprechend der Herstellerangaben pro Ansatz jeweils 0,5 µl der oben beschriebenen fluoreszenzmarkierten Antikörper hinzupipettiert. Im Anschluss an eine 30-minütige Inkubationszeit auf Eis, während der sich die fluoreszenzmarkierten Antikörper an die Oberflächenrezeptoren anlagerten, wurden die CD4⁺-T-Zellen durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1.600 rpm erneut pelletiert. Durch Waschen des Pellets mit 2 ml Standardpuffer wurden nicht gebundene Antikörper entfernt und im Anschluss 100 µl Paraformaldehyd als Fixativ hinzugegeben. Erfolgte die Messung erst am darauffolgenden Tag, wurden die solchermaßen vorbereiteten Zellen dunkel und bei 4 °C bis zur Messung gelagert, um die Stabilität der Färbung zu gewährleisten.

5.3.5.2 Durchflusszytometrie-Messung

Das Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie basiert darauf, dass einzelne Zellen mit hoher Geschwindigkeit an einem Laserstrahl vorbeiwandern und die Strahlen des Lasers durch die Zelle gebeugt und gestreut werden. Diese Lichtsignale werden von Detektoren aufgenommen. Deren Analyse lässt Rückschlüsse auf Zellgröße und -granularität zu und erlaubt somit die Bestimmung des Zelltyps. Falls bestimmte Zellproteine durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper markiert waren, kann zudem die Fluoreszenz der jeweiligen Antikörper gemessen und auf diesem Weg die Expression des jeweiligen Proteins quantitativ analysiert werden. Die Vereinzelung der Zellen gelingt durch hydrodynamische Fokussierung. Hierzu wird eine Trägerflüssigkeit mit konstantem Druck durch eine Mikrokanalküvette gespült, sodass sich eine laminare Strömung bildet. Die stark verdünnten Zellen werden nun mit einem höheren Druck in die Mitte der Trägerflüssigkeit eingebracht, sodass sich die beiden Flüssigkeiten nicht

vermischen, sondern die Zellen hintereinander aufgereiht werden (HULETT et al., 1969). Die vereinzelt Zellen passieren einen senkrechten Laserstrahl. Das Licht wird an der Zelle gebeugt, sodass die hinter der Zelle gemessene Lichtintensität, die als Forward-Scatter (Vorwärtsstreulicht, FSC) bezeichnet wird, proportional zur Zellgröße ist. Trifft das Laserlicht in der Zelle auf Strukturen innerhalb der Zelle (Granula), wird das Licht gebrochen und im schrägen Winkel zum Einstrahlungswinkel als Sideward-Scatter (Seitwärtsstreulicht, SSC) gemessen. Da mehr Licht gestreut wird, wenn viele Granula in der Zelle sind, verhält sich der Sideward-Scatter proportional zur Zellgranularität (ROTHER, 2007). Wurden bestimmte Zellproteine zusätzlich mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper markiert, regt der Laser das Fluorochrom an, Licht einer definierten Wellenlänge zu emittieren. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zur vorhandenen Menge des markierten Proteins. Mit dem BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer, das über einen blauen Laser mit 488 nm und einer Leistung von 20 Milliwatt (mW) sowie einen roten Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm und einer Leistung von 17 mW verfügt, können 3 fluoreszierende Farbstoffe gleichzeitig gemessen werden (BD BIOSCIENCES, 2011). In dieser Arbeit wurde der rote Laser des Durchflusszytometers eingesetzt, um das Fluorochrom Allophycocyanin A (APC-A) zu einer Emission von rotem Licht bei 660 nm anzuregen (BD BIOSCIENCES, 2021b). Gekoppelt an CXCR3 wurde APC-A zur Messung der CXCR3-Menge verwendet. Zur Identifizierung der CD4⁺-T-Zellen wurde Alexa Fluor 488-A (FITC Mouse Anti-Human CD4) eingesetzt, eine modifizierte Form von Fluoreszin-Isothiocyanat, welches durch den blauen Laser angeregt wird, grünes Licht bei 520 nm zu emittieren (BD BIOSCIENCES, 2021a). Der schematische Aufbau eines Durchflusszytometers ist in Abbildung 7 gezeigt.

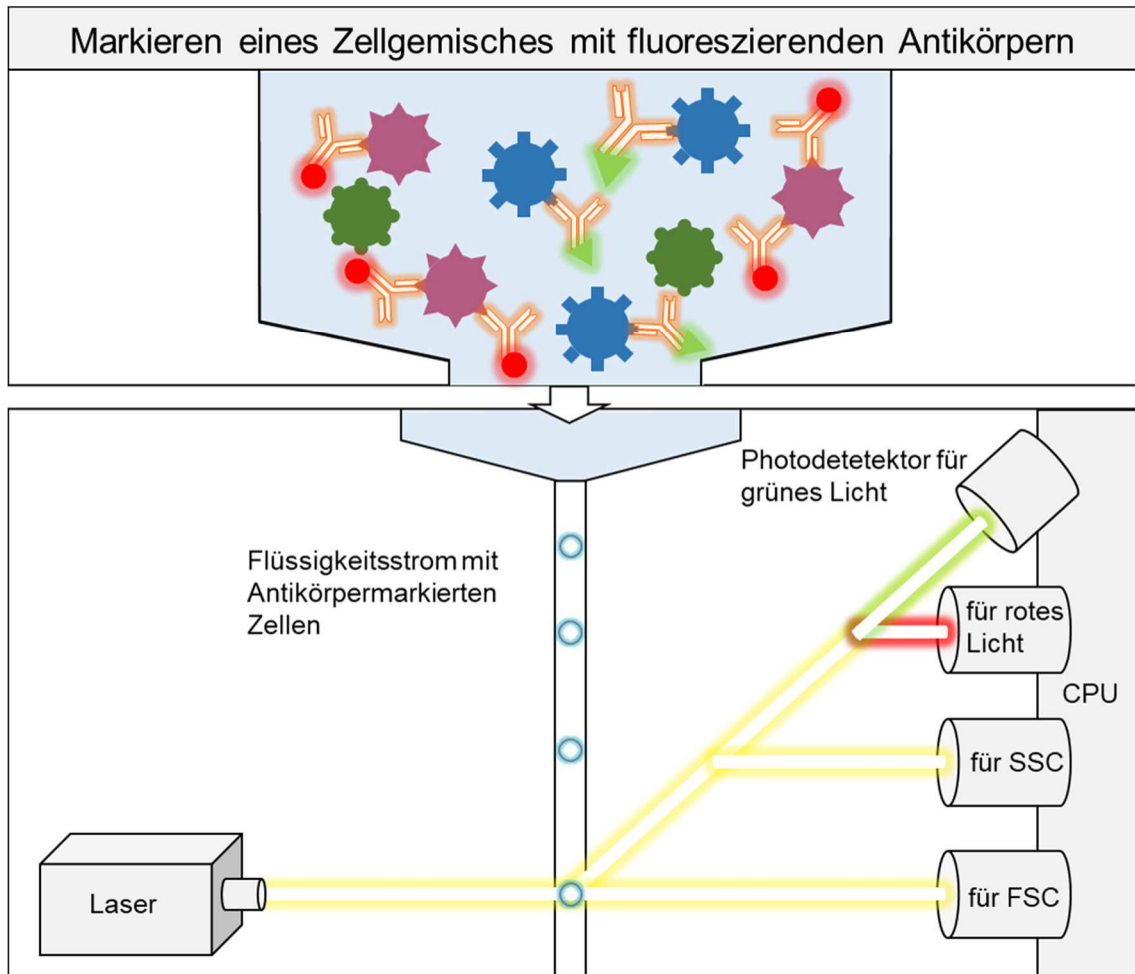


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers. Ein Zellgemisch wird mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. Die Zellen werden durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt. Dafür wird das Zellgemisch in eine linear fließende Trägerflüssigkeit injiziert und durch eine schmale Mikrokanalküvette geleitet, deren Durchmesser durch die Trägerflüssigkeit weiter verkleinert wird. Die einzelnen Zellen bewegen sich mit hoher Geschwindigkeit im Flüssigkeitsstrom an einem senkrecht stehenden Laser vorbei. Gegenüber dem Laser befindet sich ein Sensor, der die Intensität des an der Zelle gebeugten Laserlichts misst. Dieser Messwert verhält sich proportional zur Zellgröße. Granula innerhalb der Zelle brechen Licht, welches seitlich streut und von Interferenzspiegeln zu weiteren Detektoren für die Seitwärtsstreuung und verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe geleitet wird. Alle gemessenen Daten werden an einen Computer übertragen. Abkürzungen: FSC = Vorwärtsstreulicht, SSC = Seitwärtsstreulicht. Modifiziert nach (MURPHY, 2018)

5.3.5.3 Durchflusszytometrie-Auswertung

Die Daten aus Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht werden mithilfe eines Computerprogramms (BD FACSDiva™ Software) in einem Punktdiagramm aufgetragen, anhand dessen verschiedene Zellpopulationen abgegrenzt werden können. Durch das „Gating“ können einzelne Zellpopulationen selektiert und ausschließlich die Fluoreszenzmesswerte dieser Zellen betrachtet werden. In Abbildung 8 sind exemplarisch Ergebnisse der Durchflusszytometrie sowie deren Auswertung dargestellt.

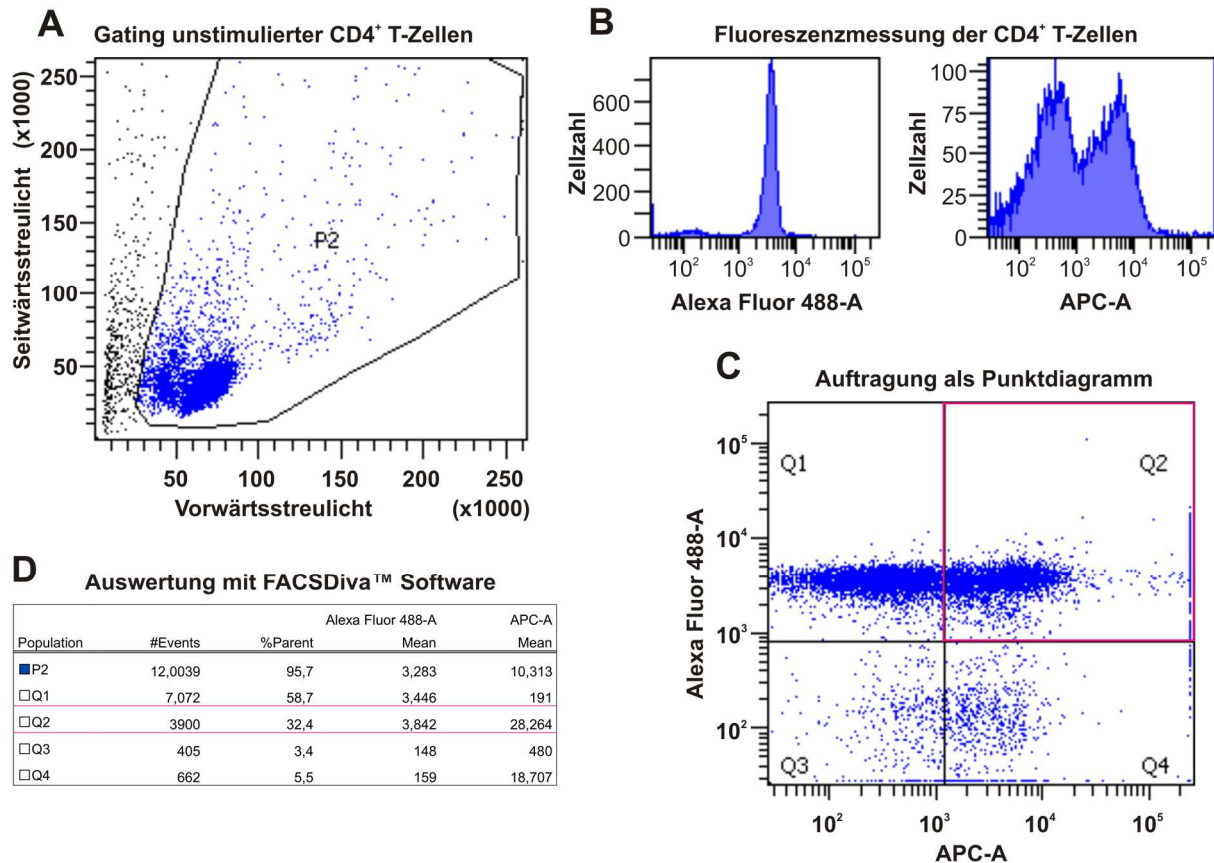


Abbildung 8: Durchflusszytometrie. (A) Passiert eine Zelle den Laserstrahl, kann durch Beugung und Brechung ein Vorwärts- sowie ein Seitwärtsstreulicht gemessen werden. Die Intensität des Vorwärtsstreulichts ist hierbei proportional zur Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht die Granularität der Zelle ebenfalls proportional widerspiegelt. Dementsprechend kann für jede gemessene Zelle ein Punkt in das abgebildete Diagramm eingetragen werden. Zellen eines Zelltyps verfügen über eine ähnliche Größe und Granularität und sind daher in diesem Diagramm in Clustern abgebildet. Diese können durch Gating selektiert werden, sodass im weiteren Verlauf nur die Messwerte dieser Zellen betrachtet werden. Da in diesem Versuch ausschließlich CD4⁺-T-Zellen gemessen wurden, diente das Gating dem Ausschluss besonders kleiner Zellen, da angenommen wurde, dass es sich hierbei um Zellschrott handelte. (B) Ebenfalls wurden durch das Laserlicht antikörpergekoppelte Fluorochrome zur Emission von Licht angeregt. Die Intensität der Fluoreszenzlichts ist hierbei proportional zur Menge des jeweils markierten Antigens. Das Fluorochrom Alexa Fluor 448-A ist an einen CD4-Antikörper gekoppelt, während APC-A einen CXCR3-Antikörper markiert. (C) Die Fluoreszenzmessungen jeder einzelnen Zelle wurden, ähnlich wie bei der Messung von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, in ein Punktdiagramm zusammengeführt. Es wurde definiert, ab welcher Fluoreszenzintensität die Zelle als „positiv“ für CD4 bzw. CXCR3 gilt und dementsprechend das Diagramm in vier Quadranten aufgeteilt. In Q2 (Magenta) befindet sich die Population der CD4⁺CXCR3⁺ Zellen. (D) Der Computer berechnete für jeden dieser Quadranten sowohl den Anteil an der Gesamtzellzahl sowie den *mean*, welcher dem Mittelwert der gemessenen Fluoreszenzwerte in diesem Quadranten entsprach.

Bei der Messung von zwei Fluoreszenzintensitäten können diese ebenfalls in ein XY-Diagramm aufgetragen werden. Entlang der definierten Fluoreszenzgrenzwerte, ab denen eine Zelle als positiv für das markierte Protein gewertet wird, kann das Diagramm in vier Quadranten unterteilt werden. Das Computerprogramm gibt prozentual die Anzahl der Zellen in jedem Quadranten an. Um die Menge an vorhandenem Protein quantitativ zu bestimmen, wurde der Mittelwert (*mean*) berechnet. Hierbei wurden die Fluoreszenzintensitäten aller Zellen des jeweiligen Quadranten addiert und durch die Zellzahl dividiert.

Die Technik der Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die CXCR3-Expression von mit miR-34a-5p transfizierten, stimulierten CD4⁺-T-Zellen zu untersuchen. Die Fluoreszenzfärbung der CD4⁺-T-Zellen mit anti-CD4-Antikörpern diente der Überprüfung der Reinheit der isolierten CD4⁺-T-Zellen. Die isolierten CD4⁺-T-Zellen wurden in Triplikaten mit miR-34a-5p bzw. mit ANC transfiziert und wie oben beschrieben gefärbt. Die Datenanalyse erfolgte durch die BD FACSDiva™ Software. Durch Gating wurden kleine, wenig granuläre Zellen unter der Annahme von Zellschrott ausgeschlossen. Die Fluoreszenzemissionen der restlichen Zellen wurden in einem XY-Diagramm, das in Quadranten aufgeteilt war, abgebildet. Die CXCR3⁺ CD4⁺-T-Zellen waren im Q2-Quadranten abgebildet. Ihr prozentualer Anteil an der Gesamtheit der Zellen wurde von der Software berechnet. Der Anteil aufgrund unspezifisch gebundener Antikörper fälschlicherweise als CXCR3⁺ getesteter T-Zellen wurde durch Subtraktion des Q2-Werts der Isotypkontrolle eliminiert. Um festzustellen, ob das CXCR3-Niveau abhängig von der miR-34a-5p-Expression ist, wurde die relative Expression von CXCR3 auf mit miR-34a-5p transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit ANC kontrolltransfizierten Zellen berechnet.

5.4 Dual-Luciferase-Reporter-Assay

(GREER, SZALAY, 2002)

Um die Bindung der miR-34a-5p an vorhergesagte Bindestellen in 3'UTRs möglicher Zielgene nachzuweisen, wurde das Dual-Luciferase® Reporter-Assay-System von Promega eingesetzt. Hierbei wurde die 3'UTR des zu testenden Gens am 3'-Ende des Firefly-Luciferase-Gens in den pMIR-RNL-TK kloniert. Das Firefly-Luciferase-Gen fungiert als Reportergen, dessen Expression aufgrund von Biolumineszenz quantifizierbar ist. Die Firefly- bzw. Renilla-Luciferasen setzen Luciferin in Anwesenheit von ATP und Magnesiumionen (Mg²⁺), bzw. Coelenterazin, unter Superoxidation(O₂⁻)-Verbrauch um. Bei dieser Reaktion wird ein Photon freigesetzt, dessen Lichtemission von einem Luminometer gemessen werden kann. Die Lichtemission ist proportional zur vorhandenen Menge an Luciferase. Bei der Durchführung des Dual-Luciferase-Assays wurde zunächst die Firefly-Luciferase-Reaktion über 10 s gemessen, die Reaktion daraufhin abgestoppt und dann die Reaktion der Renilla-Luciferase gemessen. Sowohl das Firefly- als auch das Renilla-Luciferase-Gen befinden sich auf demselben verwendeten Reporterplasmid pMIR-RNL-TK. Die Firefly-Luciferase-Expression wird von der fremdeingebrachten 3'UTR kontrolliert. Die Renilla-Luciferase-Expression wird durch einen konstitutiv aktiven Promoter reguliert. Dies ermöglicht durch Bildung des Quotienten aus Firefly- und Renilla-Luciferase-Messwert eine Normierung auf die Transfektionseffizienz. Bei der Durchführung des Versuchs wurden zunächst 7×10⁴ HEK293T-Zellen in jede Kavität einer 24-Well-Platte ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h inkubiert. Daraufhin erfolgte

die Transfektion unter Verwendung von PolyFect™ entsprechend des Herstellerprotokolls. Pro Well wurden jeweils 0,8 µl pSG5 Effektorplasmid sowie 0,2 µl pMIR-RNL-TK-Reporterplasmid eingesetzt.

Die pMIR-RNL-TK-Vektoren enthielten die zu untersuchende 3'UTR, die pSG5-Plasmide die miR-34a-5p. Als Negativkontrolle und für die Normierung wurden die leeren Vektoren entsprechend des in Tabelle 27 aufgeführten Transfektionsschemas transfiziert.

Tabelle 27: Transfektionsschema für HEK293T-Zellen. 48 h nach Transfektion wurde ein Dual-Luciferase-Assay durchgeführt.

Nr.	Konstrukte				
	pSG5	pSG5- miR-34a-5p	pMIR-RNL-TK	pMIR-CXC-3'UTR	pMIR-CXC mut-3'UTR
	[µg]	[µg]	[µg]	[µg]	[µg]
1	0,8		0,2		
2	0,8		0,2		
3		0,8	0,2		
4		0,8	0,2		
5	0,8			0,2	
6	0,8			0,2	
7		0,8		0,2	
8		0,8		0,2	
9	0,8				0,2
10	0,8				0,2
11		0,8			0,2
12		0,8			0,2

Die zu transfizierende DNA wurde in Reaktionsgefäße vorgelegt und 25 µl DMEM hinzupipettiert. Daraufhin wurde ein Mastermix, bestehend aus 2 µl PolyFect™ und 25 µl DMEM je Ansatz, hergestellt, von dem im Anschluss je 25 µl in jedes Reaktionsgefäß zugeführt wurden. Nach kurzem Abzentrifugieren folgte eine 10-minütige Inkubationszeit, während der sich die DNA an die Dendrimere anlagerte. Abschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise über die Zellen gegeben.

Nach weiteren 48 h Inkubation wurden die Zellen mit 100 µl Passive Lysis Buffer (PLB) für 15 min auf dem Schüttler lysiert. In einer Abweichung vom Herstellerprotokoll wurde das Lysat 1:100 mit PLB verdünnt. In Reaktionsgefäßen wurden jeweils 50 µl LAR II-Substrat für die Firefly-Luciferase vorgelegt. Zum Start der Messungen wurden 10 µl Zelllysate in das erste Reaktionsgefäß hinzugegeben und nach kurzem Mischen im direkten Anschluss die Lichtemission für 10 s im Luminometer bestimmt. Nachdem dieser Schritt mit allen Proben wiederholt worden war, wurden 50 µl Stop and Glo, welches die Firefly-Luciferaseaktivität stoppte und zugleich als Substrat der Renilla-Luciferase fungierte, hinzupipettiert und für weitere 10 s die Aktivität der Renilla-Luciferase gemessen. Da in den ersten Ansätzen die Effekte des leeren Expressionsvektors bzw. des miRNA-Expressionsplasmids auf das leere Reporterplasmid bestimmt worden waren, konnten die weiteren Werte damit verglichen werden. Die Daten wurden zuerst mit Excel ausgewertet, danach wurde mit SigmaPlot ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt, um die Signifikanz der Abweichungen zu bestimmen. Als statistisch signifikant wurden *probabilitas(p)*-Werte $\leq 0,05$ angenommen.

5.5 RNA-Techniken

5.5.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

(CHOMCZYNSKI, SACCHI, 1987)

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den transfizierten M1-Makrophagen wurde das miRNeasy Micro Kit (cat No 217084) von QIAGEN gemäß des Herstellerprotokolls eingesetzt, welches mithilfe von QIAzol, einer Phenol- und Guanidinthiozyanat-Lösung, Proteine und DNA von RNA trennt. Das Guanidinthiozyanat inhibiert darüber hinaus RNAsen und unterstützt die Zelllyse. Mit der QIAzol-Lösung wurde eine Gradientenzentrifugation der homogenisierten Zellen durchgeführt, Chloroform unterstützt die Phasentrennung. Die RNA konnte durch eine Säulenaufreinigung, basierend auf dem Prinzip der Ionen-Austausch-Chromatographie, aus der wässrigen Phase des Gradienten gewonnen werden. Die transfizierten und stimulierten Makrophagen wurden 4 h nach der Stimulation geerntet. Hierfür wurde der Überstand abgenommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt und 6 min bei 1.600 rpm und RT zentrifugiert, um die darin enthaltenen abgelösten Zellen zu pelletieren. Das Zellpellet sowie die Zellkulturplatte wurden mit DPBS gewaschen, um extrazelluläre RNAs zu entfernen. Daraufhin wurden 700 µl QIAzol auf die Platte gegeben und 5 min zur Lyse der adhären Zellen inkubiert. Danach wurde das QIAzol samt den lysierten Zellen abgenommen und zu dem Zellpellet pipettiert. Die Probe wurde 1 min gevortext, um auch die noch intakten Zellen zu lysieren, und im Anschluss 5 min bei RT zur Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden 140 µl Chloroform hinzupipettiert, das geschlossene Reaktionsgefäß weitere 15 s gevortext und für weitere 2-3 min bei RT inkubiert. Durch 15-minütiges Zentrifugieren mit 12.000xg bei 4 °C bildeten sich 3 Phasen: Am Boden des Reaktionsgefäßes lagerte sich eine dichte, rot gefärbte organische Schicht ab, die aus Phenol und Chloroform bestand, in der die unpolaren Proteine gelöst vorlagen, mittig befand sich eine weiße Intermediärphase, zusammengesetzt aus denaturierten Proteinen und DNA-Molekülen. Zuerst bildete sich eine durchsichtige, die polare RNA enthaltende wässrige Phase, die vorsichtig abgenommen und in ein steriles, RNase-freies Reaktionsgefäß überführt wurde. Es wurde das 1,5-fache des Phasenvolumens (525 µl) von 100 %-igem Ethanol hinzugegeben und vermischt. 700 µl der Suspension wurden auf eine im Kit enthaltene Säule pipettiert, die daraufhin 15 s mit 10.000 rpm bei RT zentrifugiert wurde. Die RNA lagerte sich an die Säulenmembran an, sodass der Durchfluss verworfen werden konnte. Daraufhin wurde der Arbeitsschritt mit dem Rest der Suspension wiederholt. Zum Waschen der Membran wurden 500 µl Puffer RPE aus dem Kit auf die Säule pipettiert und diese erneut 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert, dieser Schritt wurde einmal wiederholt. 500 µl 80 %-iges Ethanol wurden auf die Membran gegeben und ein erneuter, 2-minütiger Zentrifugationsschritt bei 10.000 rpm durchgeführt. Die Säule wurde auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Das Trocknen der Säulenmembran erfolgte durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 10.000 rpm. Nach dem Trocknungsschritt wurde das Reaktionsgefäß erneut gewechselt. Die in der getrockneten, gewaschenen Säule enthaltene RNA wurde in 14 µl nukleasefreiem ddH₂O gelöst und 1 min durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit eluiert. Alternativ konnten die auf die Isolation der oberen Phase folgenden Schritte automatisiert im QIAcube durchgeführt werden. Die RNA-Konzentration und -Reinheit der Eluate wurde mittels NanoDrop™ bestimmt und die Proben bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C gelagert.

5.5.2 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA-Banken für cDNA und qPCRs zum Nachweis von miRNAs

(BANK et al., 1972; KACIAN et al., 1972)

Um RNA als Template in einer qPCR einzusetzen zu können, wurde diese zuvor in cDNA umgeschrieben, da RNA zu instabil ist, um als Matrize zu fungieren. Das Enzym Reverse Transkriptase kommt natürlicherweise in Retroviren vor; dort dient es dem Einschleusen des viralen Genoms in die DNA einer Wirtszelle. Die Reverse Transkriptase hat die Funktionen einer RNA oder DNA-abhängigen DNA-Polymerase sowie einer RNase H. (COFFIN et al., 1997) Bei der Durchführung der reversen Transkription *in vitro* lagert sich an einem Poly-A-Schwanz am 5'-Ende der RNA-Oligo-dT-Primer an, dort kann die Reverse Transkriptase ansetzen und die cDNA in 5'-3'-Richtung synthetisieren. Im Anschluss verdaut die RNase H

die RNA. *In vivo* würde nun die DNA-abhängige DNA-Polymerase den Doppelstrang synthetisieren, dieser Schritt entfällt jedoch bei der reversen Transkription *in vitro*.

5.5.2.1 Reverse Transkription mittels Omniscript RT Kit

Zur Gewinnung von mRNA-basierten Templates für cDNA-Banken wurde das Omniscript RT Kit von QIAGEN eingesetzt. Entsprechend der Kitvorgaben wurden reverse Transkriptions-Ansätze hergestellt, die 1 h bei 37 °C im Thermocycler inkubierten. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren. In Tabelle 28 ist der verwendete Standard-Ansatz zur reversen Transkription mittels Omniscript-RT-Kit aufgeführt.

Tabelle 28: Zusammensetzung eines Omniscript RT Kit Ansatzes zur Umschreibung von mRNA in cDNA.

Reagenz	eingesetztes Volumen
10× RT-Puffer	2 µl
dNTP-Mix 5 mM jedes dNTP	2 µl
Oligo-dT-Primer (10 µM)	2 µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 µl
RNAse Inhibitor (10 units/µl)	1 µl
Vorlagen-RNA	variabel
RNAse-freies Wasser	ad 20 µl

Im Anschluss an die reverse Transkription erfolgte eine Konzentrationsmessung mittels NanoDrop™. Darüber hinaus wurde der Erfolg der reversen Transkription mit einer PCR, bei der Primer des Haushaltsgens β -Actin eingesetzt wurden, überprüft. Im Zuge der anschließenden Gelelektrophorese wurde bei qualitativ hochwertiger cDNA eine β -Actin-Bande von 500 bp erwartet. Es wurden cDNAs verschiedener Zellen verwendet, da die Genexpression und damit das mRNA-Niveau zelltypabhängig variiert.

5.5.2.2 miScript II RT Kit

Die Umschreibung von RNA in cDNA-Templates für die qPCR erfolgte mittels miScript II RT Kit von QIAGEN. Dieses ist spezifisch für die reverse Transkription kleiner RNAs wie miRNAs und *small nucleolar RNAs* (snoRNAs) für die nachfolgende qPCR konzipiert. Neben der

miRNA wird eine synthetische RNA, die *miRNA reverse transcription control* (miRTC), mitgeführt, die als Qualitätskontrolle der reversen Transkription in der qPCR dient. Da miRNA und snoRNA über keinen Poly(A)-Schwanz verfügen, wurden diese zu Beginn des Protokolls zunächst polyadenyliert, damit sich ein Poly-dT Primer unabhängig von der miRNA Sequenz anlagern konnte. Das 3'-Ende des Primers bestand aus einer Ankersequenz, der unspezifische Bindungen an verschiedene kleine RNAs ermöglichte, am 5'-Ende befand sich eine universelle Bindesequenz für den Reverse-Primer der qPCR. Es wurde ein Reaktionsansatz nach den in Tabelle 29 aufgeführten Angaben hergestellt, dieser wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 29: Zusammensetzung eines miScript II RT Kit-Reaktionsansatzes für die reverse Transkription kleiner RNAs zur Durchführung von qPCRs.

Reagenz	eingesetztes Volumen
5× miScript HiSpec-Puffer	4 µl
10× miScript Nucleics-Mix	2 µl
miScript Reverse Transkriptase-Mix	2 µl
Vorlagen-RNA	variabel
RNAse-freies Wasser	ad 20 µl

Abschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 95 °C, um den Reverse Transkriptase-Mix zu inaktivieren.

5.5.1 Quantitative Echtzeit-PCR (*real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR*)

(HIGUCHI et al., 1993)

Die qPCR wird für Genexpressionsanalysen verwendet, da sie, im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, eine quantitative Bestimmung der Ursprungssequenz ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden qPCRs unter Verwendung des miScript SYBR® Green PCR Kits von QIAGEN durchgeführt, um eine erfolgreiche Transfektion von M1-Makrophagen mit miR-34a-5p nachzuweisen. Die zu analysierende RNA wurde hierfür zunächst in cDNA umgeschrieben, die als Vorlage in der qPCR eingesetzt wurde. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green, welcher mit doppelsträngiger DNA interkaliert, ermöglicht die quantitative Analyse der neusynthetisierten PCR-Produkte. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zu der Anzahl der synthetisierten Doppelstränge, welche während der zweiten Phase der qPCR

exponentiell zunimmt. Am Ende einer jeden Elongationsphase wird die Fluoreszenz gemessen. Hierbei wird festgehalten, nach wie vielen Zyklen ein zuvor definierter Fluoreszenzschwellenwert (C_t -Wert, *cycle threshold*) erreicht wird. Diese Zykluszahl wird als C_q (*quantification cycle*) bezeichnet. Je weniger Zyklen zum Erreichen dieses Grenzwertes benötigt wurden, umso mehr Kopien des Matrizenstranges waren ursprünglich in der untersuchten Probe vorhanden. Die qPCRs wurden durch Lena Krammes, Doktorandin am Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes, durchgeführt und ausgewertet. Zur Durchführung der qPCR wurde ein Mastermix nach dem in Tabelle 30 abgebildeten Schema angesetzt.

Tabelle 30: Zusammensetzung eines qPCR-Mastermix, einfache Menge.

Reagenz	Endkonzentration	eingesetztes Volumen
2× QuantiTect SYBR Green PCR-Mastermix	1×	10 µl
10× miScript Universal-Primer	1×	2 µl
miScript Primer Assay	1×	2 µl
RNase-freies Wasser		4 µl

Der Mastermix wurde in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und jeweils 2 µl der entsprechenden cDNA hinzupipettiert.

Nach dem Abdichten der Platte wurde diese gevortext, abzentrifugiert und die qPCR mit Hilfe des StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems von Thermo Fisher Applied Biosystems™ durchgeführt. In Tabelle 31 ist das üblicherweise verwendete qPCR-Programm aufgeführt.

Tabelle 31: Voreingestelltes qPCR-Cycler-Programm. Zuerst erfolgte die Vervielfältigung der Vorlagen-cDNA durch zyklische Wiederholung der ersten vier Temperaturstufen. Im Anschluss an die qPCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Qualitätskontrolle durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Dauer und Anzahl Wiederholungen	
Initiale Aktivierung der HotStarTaq DNA-Polymerase	95 °C	15 min	1x
Denaturierung	94 °C	15 s	
Annealing	55 °C	30 s	40x
Elongation	70 °C	30 s	
Schmelzkurvenanalyse	+ 0,3 °C ab 60 °C	15 s	1x

Zur Beurteilung der Amplifikationspezifität folgte nach Beendigung der Polymerasekettenreaktion eine Schmelzkurvenanalyse. Hierfür wurde beginnend bei 60 °C alle 15 s die Temperatur um 0,3 °C erhöht, bis 95 °C erreicht wurden. Mit steigender Temperatur denaturierten die Doppelstrangbindungen der Amplifikate, woraufhin SYBR® Green nicht mehr gebunden und infolgedessen weniger Fluoreszenz emittiert wurde. Lagen in einer Probe ausschließlich die identischen Amplifikate einer der Zielsequenzen vor, senkte sich aufgrund einer einheitlichen Schmelztemperatur, welche als die Temperatur definiert ist, bei der 50 % der Doppelstrangbindungen gelöst sind, das Fluoreszenzsignal einmalig. Befanden sich jedoch unterschiedliche Amplifikate in der Probe, nahm das Fluoreszenzsignal aufgrund der unterschiedlichen Schmelzpunkte stufenweise ab. Neben dem Primer, der für das zu untersuchende Amplifikat spezifisch war, wurden zur Normierung der Ergebnisse sowie zur Überprüfung der PCR-Funktionalität Ansätze mit der gleichen cDNA, jedoch mit snoRNA-Primern, mitgeführt. Die snoRNAs RNU48 und RNU6 werden zelltypübergreifend in stabilen Mengen exprimiert, daher wurden Ansätze, die RNU48- oder RNU6-Primer enthielten, zur Normierung der Messergebnisse verwendet. Zur Überprüfung der Effizienz der reversen Transkription wurde eine miRTC-Kontrolle mitgeführt. Hierbei handelt es sich um eine artifizielle miRNA, die in einer definierten Menge im 10x miScript Nucleics Mix enthalten ist. Daher kann bei einer korrekt abgelaufenen reversen Transkription ein konstanter C_q -Wert in der qPCR erwartet und die Vergleichbarkeit der Messwerte bestätigt werden. Um eine Verunreinigung der Reagenzien auszuschließen, wurde ergänzend für jeden Primer ein qPCR-Ansatz mitgeführt, in dem die cDNA durch nukleasefreies ddH₂O substituiert wurde. Wurde in diesen Ansätzen ein C_q -Wert

<30 gemessen, war dies auf eine Kontamination mit DNA zurückzuführen. Zu der Auswertung der qPCR wurden zunächst die ΔC_q -Werte der miRNA-Expression durch Subtraktion der RNU6- C_q -Werte normiert. Aus der Differenz zwischen den normierten ΔC_q -Werten von transfizierten und nichttransfizierten Zellen, dem $\Delta\Delta C_q$ -Wert konnte daraufhin der *fold change* der miR-34a-5p in den mit miR-34a-5p-Mimic transfizierten Zellen im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen berechnet werden:

$$\text{fold change } n = 2^{-\Delta\Delta C_q}$$

Der *fold change* besagt, dass die transfizierten Zellen die n-fache Menge miR-34a-5p im Vergleich zu nichttransfizierten Zellen enthalten.

5.5.2 Genexpressionsanalyse mittels Microarray

(FODOR et al., 1991)

Zur Quantifizierung einer veränderten mRNA-Expression in aktivierten, mit miR-34a-5p transfizierten M1-Makrophagen gegenüber mit ANC transfizierten Kontrollen wurden mRNA-Microarrays durchgeführt. Hierfür wurde die Makrophagen-mRNA durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt. In einem weiteren Schritt wurde der cDNA-Strang in cRNA umgeschrieben, die zur ursprünglichen mRNA komplementär ist. Zudem wurde die cRNA durch Cytidin-5'-phosphat-3'-(6-aminoethyl)phosphat, markiert mit Cyanin 3-pCp (Cyanin 3), fluoreszenzmarkiert. Auf dem Microarray-Chip befinden sich Oligonukleotide, die einer bestimmten Position auf dem Chip zugeordnet sind. Hybridisiert die cRNA mit dem komplementären Oligonukleotid auf dem Microarray, wird an dieser Position auf dem Chip ein verstärktes Fluoreszenzsignal gemessen, wodurch eine Quantifizierung der jeweiligen cRNA-Menge möglich ist. In dieser Arbeit wurde ein SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60Kv3 Microarray von Agilent eingesetzt. Der Microarray wurde durch Lena Krammes, Doktorandin am Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes, durchgeführt und ausgewertet. Entsprechend der Anweisungen des Low Input Quick Amp Labeling Kits, one-color, ebenfalls von Agilent, wurden Ansätze mit den unterschiedlichen RNAs hergestellt. Die Zusammensetzung der Ansätze ist in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32: Ansatz zur Vorbereitung der RNA für die reverse Transkription.

Reagenz	eingesetztes Volumen
RNA	1,5 µl
Spike Mix 1:10000	2 µl
T7 Primer	0,8 µl
nukleasefreies ddH ₂ O	1 µl

Die Ansätze wurden für 10 min bei 65 °C inkubiert, um RNA, Spike Mix und Primer zu denaturieren. Im Anschluss erfolgte eine 5-minütige Kühlung auf Eis, in dieser Zeit lagerten sich die Primer an die RNA und den Spike Mix an. Daraufhin wurde ein Mastermix, der die restlichen Inhaltsstoffe für die reverse Transkription enthielt, entsprechend der nachfolgenden Tabelle 33 hergestellt.

Tabelle 33: Zusammensetzung des cDNA-Mastermix, ausreichend für 10 Ansätze.

Reagenz	eingesetztes Volumen
5x First Strand Buffer	20 µl
0,1 M DTT	10 µl
10 mM dNTP-Mix	5 µl
Affinity Script Rnase Block Mix	12 µl

Pro Ansatz wurden 4,7 µl des Mastermix eingesetzt, durch Pipettieren gemischt und für 2 h bei 40 °C inkubiert. In dieser Zeit wurde die cDNA synthetisiert. Die Reaktion wurde durch Inaktivierung des Affinity Skript-Enzyms bei 70 °C für 15 min beendet. Für die Transkription der cDNA in cRNA wurde ebenfalls ein Mastermix nach Herstellerangaben in Tabelle 34 zusammenpipettiert, zu der Probe gegeben und erneut für 2 h bei 40 °C inkubiert.

Tabelle 34: Zusammensetzung des Transkriptionsmastermix, die hier aufgeführten Mengenangaben sind für 10 Ansätze ausreichend.

Reagenz	eingesetztes Volumen
nukleasefreies ddH ₂ O	7,5 µl
5x Transcription Buffer	32 µl
0,1 M DTT	6 µl
NTP-Mix	1 µl
T7 RNA Polymerase Blend	0,21 µl
Cyanine 3-CTP	0,24 µl

Das *labeling* der cRNA erfolgte durch Cyanin-3 markiertes Cytosintriphosphat (CTP). Zur Aufreinigung der cRNA wurde das RNeasy Mini Kit von QIAGEN entsprechend des Agilent One-Color Gene Expression Microarray Protokolls eingesetzt. Die Konzentration der cRNA und des Cyanin-3 wurde mit dem Microarray Messprotokoll des NanoDrop™ 2000 Spektralphotometers bestimmt. Aus diesen Messwerten konnte die spezifische Aktivität jeder Probe berechnet werden:

$$\text{spezifische Aktivität} \left(\frac{\text{pmol}}{\mu\text{g}} \right) = \frac{\text{Konzentration Cyanin 3} \left(\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}} \right)}{1000 \times \text{Konzentration cRNA} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right)}$$

Ausschließlich Proben mit einer spezifischen Aktivität von >6 Picomol (pmol) pro Mikrogramm (µg) wurden weiterverarbeitet.

Um die cRNA in Oligonukleotidfragmente zu zerlegen, wurden jeweils 600 ng cRNA mit den in Tabelle 35 aufgelisteten Substanzen pipettiert.

Tabelle 35: Auflistung der für den Microarray Fragmentation Mix benötigten Substanzen sowie der eingesetzten Mengen.

Reagenz	Endkonzentration	eingesetztes Volumen
cRNA	600 ng	
10x Gene Expression Blocking Agent	2,5x	5 µl
25x Fragmentation-Puffer	1x	1 µl
nukleasefreies ddH ₂ O		ad 25 µl

Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 60 °C. Die Reaktion wurde durch Kühlen auf Eis abgestoppt. Weiterhin wurden 35 µl 2× Hi-RPM Hybridization-Puffer hinzugegeben und vorsichtig mit der cRNA vermischt. Um Blasen zu reduzieren und die Mischung auf dem Boden des Gefäßes zu sammeln, folgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis gelagert.

Für die Hybridisierung wurden die cRNA-Fragmente auf den Microarray-Slide mit Probefeldern aufgetragen und in der nach Herstellerangaben zusammengesetzten SureHyb-Kammer im Agilent Microarray-Hybridisierungssofen 17 h bei 65 °C und 20 rpm inkubiert. Im Anschluss an die Hybridisierung wurde der Slide mit zwei Gene Expression-Triton X-102-haltigen Waschpuffern für jeweils 1 min gewaschen. Im Anschluss wurden die Fluoreszenzsignale der Microarrays mit dem Agilent Microarray-Scanner detektiert und mittels Agilent Feature Extraction-Software ausgewertet, indem eine Hintergrundkorrektur durchgeführt wurde. Die Normalisierung der Werte erfolgte mittels Biological-Significance-Analyse, die mit GeneSpring durchgeführt wurde. Durch diese Analyse wurden die Expressionswerte für jedes getestete Transkript ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich mRNAs mit RefSeq-Accession Nummer ausgewertet, die zudem in mindestens 4 der insgesamt 8 Proben detektiert werden konnten. Die Genexpressionsdifferenzen der mit miR-34a-5p-Mimic und mit ANC transfizierten Proben wurden durch die Berechnung des *fold change* entsprechend der nachfolgenden Formel verglichen.

$$\text{fold change } n = 2^{\text{Expression (miR-34a-5p Probe)} - \text{Expression (ANC-Probe)}}$$

Der *fold change* besagt, dass die transfizierten Zellen die *n*-fache Menge einer Oligonukleotids im Vergleich zu den nichttransfizierten Zellen enthalten.

5.5.2.1 Aufreinigung der cRNA

Das RNeasy Mini Kit von QIAGEN wurde zur Aufreinigung der cRNA für Microarrays eingesetzt. Für die Aufreinigung der cRNA wurde das Kit nicht nach den Herstellerangaben, sondern entsprechend des Agilent One-Color Gene Expression Microarray Protokolls eingesetzt. Hierfür wurden 84 µl nukleasefreies ddH₂O zu dem die cRNA enthaltenden Ansatz hinzugeben und vorsichtig mit 350 µl RLT-Puffer gemischt. Im nächsten Schritt wurden 250 µl reines Ethanol zugefügt und ebenfalls durch Pipettieren vermischt. Eine RNeasy Mini Spin-Säule wurde auf ein Sammelgefäß positioniert und die gesamten 700 µl Probe auf die Säule gegeben. Bei 4 °C erfolgte eine 30-sekündige Zentrifugation mit 13.000 rpm. Hierbei wurde die cRNA an die Säule gebunden, der Überstand konnte verworfen werden. Die Säule wurde mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und erneut für 30 s bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert.

Das Sammelgefäß mit dem darin enthaltenen Überstand wurde verworfen, die Säule wurde auf ein neues Behältnis positioniert und erneut zentrifugiert, um die letzten Pufferreste zu entfernen. Für die Elution der cRNA wurde die Säule auf ein frisches, RNase-freies Eppendorfggefäß positioniert und 30 µl nukleasefreies ddH₂O auf die Säulenmembran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 s erfolgte eine letzte Zentrifugation bei 4 °C für 30 s und 13.000 rpm. Die Säule konnte nun verworfen werden. Das Eppendorfggefäß, in dem sich die cRNA befand, wurde auf Eis gelagert.

5.5.3 Qualitätsbestimmung von RNA mittels Bioanalyser

(PANARO et al., 2000)

Um sowohl die Qualität als auch die Konzentration von isolierter RNA zu bestimmen, wurde das RNA 6000 Nano Kit von Agilent eingesetzt. Hierbei wurde auf einem Nanochip, in dem sich mehrere gelgefüllte Kapillaren befinden, eine elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäurefragmente durchgeführt. In der Vorbereitung wurde ein DNA-Größenstandard 2 min bei 70 °C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. Das Gel wurde für eine Dauer von 10 min bei 1.500 g bei RT durch einen *spin filter* zentrifugiert. Sowohl das Gel als auch der Größenstandard können für mehrere Messungen im Voraus vorbereitet und aliquotiert gelagert werden. Nach 30-minütiger Inkubation der Reagenzien bei RT wurde 1 µl RNA *dye concentrate*, ein fluoreszierender, mit RNA interkalierender Farbstoff, zu 65 µl Gel gegeben und durch Vortexen gemischt. Darauffolgend wurde das Gelgemisch mit 13.000 g für 10 min bei RT zentrifugiert. Entsprechend des Herstellerprotokolls wurden 9 µl Gel in der Priming-Station in die Microchannels des Nanochip gepresst. In die weiteren Kavitäten des Chips wurde je 5 µl Marker gegeben und 1 µl einer RNA Probe bzw. 1 µl des Größenstandards aufgetragen. Der beladene Chip wurde 1 min bei 2.400 rpm gevortext und das 30-minütige Analyseprogramm des Agilent Bioanalyser 2100 gestartet. Es wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die RNA-Banden durch den fluoreszierenden Farbstoff sicht- und quantifizierbar gemacht wurden. Die Auswertung erfolgte mittels Agilent 2100 Expert-Software, welche die Resultate als Elektropherogramm sowie zu einer gelelektrophorese-ähnlichen Abbildung verrechnet darstellt. Abbildung 9 zeigt exemplarisch ein Elektropherogramm sowie eine der herkömmlichen Gelelektrophorese nachempfunde Darstellung.

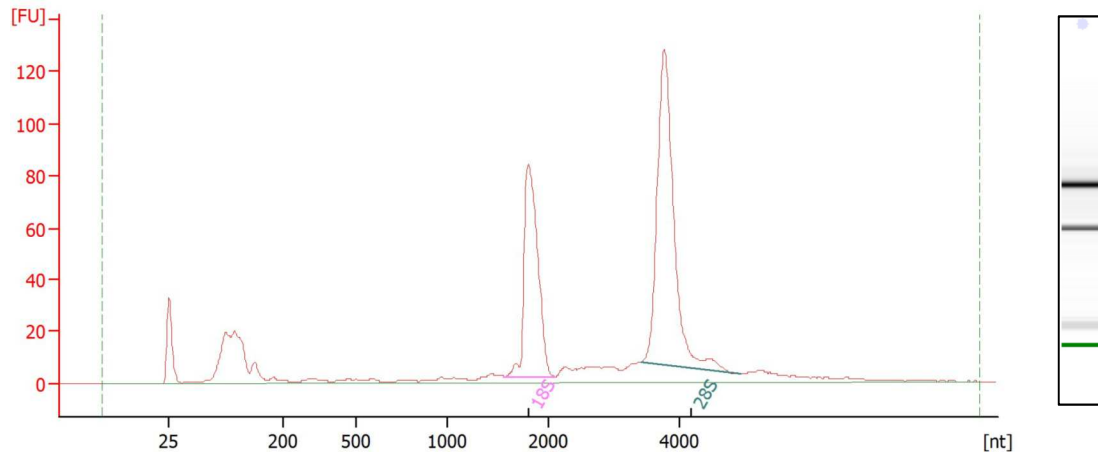


Abbildung 9: Graphische Auswertung eines Bioanalyzer-Nanochips. Im Diagramm auf der linken Seite wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten quantifiziert und der jeweiligen Nucleotidsequenzlänge zugeordnet. Die vier Peaks bilden von links nach rechts den Marker, die 5S-, 18S- und die 28S-Ribosomenuntereinheiten ab. Die rechte Abbildung zeigt die Ergebnisse derselben Messung in einer Darstellung, die der herkömmlichen Gelelektrophorese nachempfunden ist.

Das Elektropherogramm bildet die Fluoreszenzintensität in Fluoreszenzunits (FU) im Verhältnis zu den jeweiligen Nucleotidsequenzlängen ab. Da ribosomale RNAs (rRNAs) einen Großteil der zellulären RNA ausmachen, dominierten diese das Elektropherogramm. Auf der Höhe von 25 nt war die Fluoreszenzintensität des Markers zu erkennen, die 5S-Ribosomenuntereinheit konnte in Form eines Signals zwischen circa 50-200 nt detektiert werden. Die Maxima bei circa 1.800 bzw. 2.800 nt bildeten die Fluoreszenz der 18S- und 28S-Untereinheiten ab. Da die Fläche unter der Kurve die RNA-Gesamtmenge repräsentierte, wurde zur Quantifizierung der 18S- bzw. 28S-RNA der Flächeninhalt unter den jeweiligen Scheitelpunkten berechnet. Da die 28S-Untereinheit schneller als die 18S-Untereinheit degradiert, wurde das Verhältnis zwischen den beiden Flächen berechnet, um frühe Zerfallsanzeichen festzustellen. Degradierte RNA ist kürzer als intakte, wodurch sich bei schlechter Qualität der RNA der Inhalt unter den Maxima im Verhältnis zur unveränderten Gesamtfläche verkleinerte. Aus diesen beiden Verhältnissen (Quotienten) berechnete die Agilent 2100 Software eine *RNA integrity number* (RIN) zwischen 1 und 10, wobei ein Wert von 1 eine maximale RNA-Degradation anzeigt und 10 auf eine optimale RNA-Qualität hinweist.

5.6 Proteintechniken

5.6.1 Isolation von Proteinextrakten aus CD4⁺-T-Zellen

(SAMBROOK, 2001)

Zur Aufbereitung von Proteinextrakten aus mit miR-34a-5p- bzw. kontrolltransfizierten CD4⁺-T-Zellen wurden die in Flüssigkultur vorliegenden Zellen 48 h nach Transfektion für 6 min bei 1.600 rpm zentrifugiert, das Kulturmedium verworfen und das Zellpellet zweimal mit 1 ml

DPBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet in 50 µl 2x Sample Buffer (SB-Puffer) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 2x Sample Puffer enthält 3-Mercapto-1,2-propanediol und SDS zur Denaturierung der Proteine, die zudem durch SDS proportional zu ihrer Größe negativ geladen werden. Um die Zellmembran aufzuschließen, wurden die Zellen für 3x3 s mit Ultraschall behandelt und anschließend 10 min bei 99 °C zur weiteren Homogenisierung und Denaturierung inkubiert. Nach 10 min Zentrifugieren bei 15.000 rpm und 10 °C lagen die nichtlöslichen Zelltrümmer pelletiert vor. Der flüssige Überstand, in dem die Proteine gelöst waren, wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mittels Photometer konnte die Optische Dichte einer 1:100 Verdünnung in 0,1 M NaOH bei 280 nm, dem Proteinabsorptionsmaximum, bestimmt und die Proteinkonzentration der Extrakte mit der folgenden Formel berechnet werden:

$$\frac{6,4}{OD_{280}} = \text{Extraktmenge } (\mu\text{l}), \text{ die } 30 \mu\text{g Protein enthält}$$

Die Proteinextrakte wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

(SHAPIRO et al., 1967; SMITH, 1984)

Das Auftrennen des Proteinextrakts nach der Größe der einzelnen Proteinefragmente erfolgte mit einer SDS-Page. Da die Proteine durch das SDS denaturiert und proportional zur Länge, unter Überlagerung der proteineigenen Polaritäten, negativ geladen worden waren, erfolgte ihre Auftrennung allein größenabhängig. Hierbei wurden 15-20 µg Protein in die Taschen eines Mini-PROTEAN® TGX™-Polyacrylamidgradientengels pipettiert.

Die Konzentration des Gels nimmt in der Laufrichtung von 4 % bis 15 % zu, da Polyacrylamid bei steigenden Konzentrationen ein immer feiner werdendes Netz bildet, wodurch die Genauigkeit der größenabhängigen Auftrennung der Proteine verfeinert wird. An das Gel wurde ein elektrisches Feld angelegt, in dem die negativ geladenen Proteine innerhalb des Gels zur Anode wanderten. Neben den Extrakten wurde ein Proteingrößenstandard bei der Elektrophorese zur Abschätzung des Molekulargewichts mitgeführt.

5.6.3 Western Blot

(BURNETTE, 1981; TOWBIN et al., 1979)

Um die aufgetrennten Proteinbanden dauerhaft zu fixieren und sie für weitere Untersuchungen, wie z. B. Antikörperreaktionen, zugänglich zu machen, wurden die Banden unter

Durchführung eines Western Blots auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die negativ geladenen Proteine wanderten in einem elektrischen Feld auf die an das Gel angelegte Membran. Dort wurden die Banden durch hydrophobe Wechselwirkungen fixiert, ohne eine mögliche Antikörperbindung zu behindern. Diese Primärantikörper konnten wiederum durch Meerrettichperoxidase-markierte Sekundärantikörper detektiert werden. Dies ermöglichte den Nachweis der Proteinmenge mittels Chemilumineszenz.

Für den Aufbau des Blots wurde ein aufgeklappter Polyvinylchlorid(PVC)-Rahmen in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne positioniert und die einzelnen Komponenten in folgender Reihenfolge luftblasenfrei aufeinandergelegt: ein Schwammtuch, zwei Lagen Whatman-Filterpapier, das Gel, eine Nitrocellulosemembran, sowie zwei weitere Whatman-Filterpapiere und ein zweites Schwammtuch. Der so zusammengesetzte Blot wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer gestellt. Unter Rühren des Puffers wurden die Proteine mindestens 3 h bei 400 mA auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Nach dem Blotting wurden die Proteinbanden auf der Membran durch Anfärben mit Ponceau S unspezifisch sichtbar gemacht. Eine einstündige Inkubation der Nitrocellulosemembran in 5 %-iger TBST-Milch auf einem Schüttler bei RT diente dem Blocken der übrigen unspezifischen Bindestellen der Membran. Im Anschluss wurde der gewünschte Primärantikörper entsprechend des Herstellerprotokolls in einem Falcon mit 10 ml 5 %-iger TBST-Milch verdünnt und die Membran vorsichtig hineingeschoben. Nach Inkubation auf einem Rollschüttler bei 4 °C über Nacht wurde die Membran am nächsten Tag 3×15 min in TBST auf einem Schüttler inkubiert, um überschüssige Primärantikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper, der spezifisch an den Primärantikörper bindet, entsprechend der Herstellerangaben in 10 ml 5 %-iger TBST-Milch verdünnt. Die Membran wurde darin eine weitere Stunde bei 4 °C auf dem Rollschüttler inkubiert und 3×20 min mit TBS gewaschen. Für den Nachweis des Sekundärantikörpers wurde das SignalFire™ ECL Reagenz von CST eingesetzt. Die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase oxidiert Luminol unter Reduktion von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und einer Lichtemission, die durch das ChemiDoc™ Touch Imaging System der Firma Bio Rad detektiert werden konnte. Zur Normierung der Messergebnisse wurden die CXCR3-spezifischen Antikörper durch 5-minütiges Inkubieren in TBST abgewaschen und der Nachweis für das Haushaltprotein α -Tubulin mittels spezifischer Antikörper nach dem obigen Protokoll wiederholt. Die quantitative Auswertung der spezifischen Banden erfolgte durch die zugehörige Image Lab 6.0-Software.

5.6.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

(ENGVALL, PERLMANN, 1971; VAN WEEMEN, SCHUURS, 1971)

Beim ELISA handelt es sich um ein antikörperbasiertes Verfahren zum quantitativen Nachweis in Flüssigkeit vorliegender Proteine, Viren oder Toxine. In dieser Arbeit wurden die von M1-Makrophagen ins Zellkulturmedium abgegebenen Chemokine CXCL10 und CXCL11 untersucht. Zur Durchführung wurde das DuoSet ELISA von R&D Systems verwendet, welches auf dem Prinzip eines sog. „Sandwich-ELISA“ basiert. Hierbei wird die nachzuweisende Substanz mit einem *capture*-Antikörper an den Boden des Reaktionsgefäßes gebunden, bevor der für ein anderes Epitop des untersuchten Chemokins spezifische Primärantikörper hinzugegeben wird. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgt über die Bindung von Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase, die ein Substrat unter Farbumschlag umsetzt und eine Farbumschlagsreaktion katalysiert, die mittels Photometer quantifiziert werden kann. Für die ELISAs wurde der zellfreie Überstand der transfizierten und stimulierten Makrophagen 48 h nach der Transfektion verwendet.

Für das Beschichten der als Reaktionsgefäß verwendeten 96-Well-Mikrotiterplatten wurden je 100 µl des nach Herstellerangaben verdünnten *capture*-Antikörpers in die Kavitäten pipettiert und dort über Nacht bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Platte 3× mit 400 µl Waschpuffer, bestehend aus 0,5 % Tween® 20 in DPBS, gespült. Im nächsten Schritt wurden zum Blocken unspezifischer Bindungen 300 µl *reagent diluent* (Reagenzverdünnungsmittel), bestehend aus 1 %-igem BSA gelöst in DPBS, in die Wells pipettiert, 1 h bei RT inkubiert und der Waschschrift wiederholt. Um im Anschluss an den ELISA die Chemokinkonzentrationen berechnen zu können, wurde eine siebenstufige 1:2 Verdünnungsreihe, beginnend bei 2000 pg/ml, aus einem im Kit enthaltenen Standard und Reagenzverdünnungsmittel hergestellt. Entsprechend dem Auftragsschema wurden 100 µl der Verdünnungsreihe sowie der 1:10 mit Verdünnungsmittel versetzten, zu untersuchenden Überstände in die jeweiligen Wells pipettiert und abgedeckt 2 h bei RT inkubiert. Die nicht an den Antikörper gebundenen Bestandteile wurden durch erneutes dreimaliges Waschen mit 400 µl Waschpuffer entfernt. Danach erfolgte das Hinzugeben von 100 µl nach Herstellerangaben verdünntem biotinyliertem primären Dektektionsantikörper, der 1 h zum Binden an das zu untersuchende Chemokin bei RT inkubiert wurde. Nach Wiederholen des Waschschrifts wurden 100 µl nach Protokoll verdünnter Streptavidin-Meerrettichperoxidase hinzugefügt und 20 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Streptavidin bildet starke nichtkovalente Bindungen mit Biotin aus, und lagert sich daher an die Primärantikörper an. Nichtgebundenes Streptavidin wurde durch einen erneuten Waschschrift entfernt. 100 µl einer Substratlösung, bestehend aus einer 1:1 Mischung H₂O₂ und Tetramethylbenzidin, wurden in die Kavitäten einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und für 20 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Das Enzym Meerrettichperoxidase katalysiert die Reduktion von H₂O₂ zu H₂O unter Oxidation des farblosen Tetramethylbenzidins zum blauen

Charge-Transfer-Komplex aus dem Ausgangsprodukt, welches als Diamin vorliegt, und dem oxidierten Diimin. Der Charge-Transfer-Komplex steht im Gleichgewicht mit dem Trans-Tetramethylbenzidin-Radikalkation (JOSEPHY et al., 1982). Die Farbintensität ist hierbei proportional zur vorhandenen Meerrettichperoxidase menge, welche wiederum die Anzahl an gebundenem Primärantikörper und letztendlich die Quantität des untersuchten Stoffes widerspiegelt. Die Reaktion wird durch Ansäuerung mit 1-molarer Schwefelsäure gestoppt, wodurch der Charge-Transfer-Komplex zum Diimin übergeht (JOSEPHY et al., 1982). Mittels Photometer (VICTOR Multilabel Plate Reader von PerkinElmer Inc.) kann die Absorption bei 450 nm gemessen werden. Zuvor wurde eine Wellenlängenkorrektur bei 540 oder 570 nm durchgeführt, mit der unspezifische Signale detektiert und herausgerechnet werden können. Mit den Absorptionswerten der Standards berechnete das Computerprogramm WorkOut Plus MMD von PerkinElmer Inc. die Standardkurve, anhand derer über das Lambert-Beersche Gesetz die jeweiligen Chemokinkonzentrationen ermittelt werden konnte.

6 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in der Publikation „Wrinkle in the plan: miR-34a-5p impacts chemokine signaling by modulating CXCL10/CXCL11/CXCR3-axis in CD4⁺, CD8⁺ T cells, and M1 macrophages“ veröffentlicht (HART et al., 2020).

6.1 Genexpressionsanalyse mittels Microarray

In vorangegangenen Studien erwies sich die miR-34a-5p-Expression in CD3⁺-T-Zellen, CD19⁺ B-Zellen, CD14⁺ Monozyten, sowie in CD56⁺ natürlichen Killerzellen (NKs) von Lungenkrebspatienten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht (HART et al., 2016; LEIDINGER et al., 2014), was auf eine Rolle der miR-34a-5p bei der Antitumorantwort hindeuten könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss der miR-34a-5p-Überexpression auf die Genexpression von M1-Makrophagen untersucht. Dabei wurden M1-Makrophagen von zwei Spenderinnen in zwei unabhängigen Experimenten jeweils mit miR-34a-5p und oder einer Negativkontrolle (ANC) transfiziert und *in vitro* aktiviert. Anhand der Expressionen im Microarray wurden die *fold changes* der erfassten Transkripte berechnet. In Tabelle 36 sind die am stärksten hoch- bzw. herunterregulierten mRNAs zusammengefasst.

Tabelle 36: Die 20 mRNAs mit dem größten positiven bzw. negativen *fold change*.

herunterregulierte mRNAs		
Gen-Symbol	RefSeqAccession-Nummer	<i>fold change:</i> miR-34a-5p vs. ANC
<i>ERF</i>	NM_006494	-8,11
<i>RBFOX2</i>	NM_001031695	-4,27
<i>ATP10A</i>	NM_024490	-3,71
<i>CXCL11</i>	NM_005409	-3,54
<i>MARK2</i>	NM_001039469	-3,52
<i>IFNL1</i>	NM_172140	-3,21
<i>HRASLS2</i>	NM_017878	-2,89
<i>CH25H</i>	NM_003956	-2,79
<i>IFNB1</i>	NM_002176	-2,77
<i>CXCL10</i>	NM_001565	-2,71

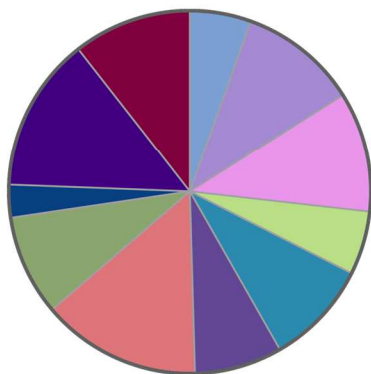
Gen-Symbol	RefSeqAccession-Nummer	fold change: miR-34a-5p vs. ANC
<i>BCL2L14</i>	NM_138722	-2,58
<i>PTPN7</i>	NM_080588	-2,57
<i>PDGFRL</i>	NM_006207	-2,54
<i>IFNA16</i>	NM_002173	-2,51
<i>CXCL10</i>	NM_001565	-2,51
<i>IFNA4</i>	NM_021068	-2,49
<i>EXT1</i>	NM_000127	-2,47
<i>C18orf54</i>	NM_173529	-2,47
<i>TSPYL2</i>	NM_022117	-2,45
<i>IL6</i>	NM_000600	-2,41
hochregulierte mRNAs		
Gen-Symbol	RefSeqAccession-Nummer	fold change: miR-34a-5p vs. ANC
<i>GALE</i>	NM_000403	6,40
<i>CAMK2D</i>	NM_001221	5,08
<i>P2RY14</i>	NM_014879	3,37
<i>ZFYVE28</i>	NM_001172657	3,25
<i>KCNF1</i>	NM_002236	2,83
<i>FAM47E</i>	NM_001242936	2,66
<i>XIRP1</i>	NM_194293	2,60
<i>ZFR2</i>	NM_015174	2,50
<i>LIPG</i>	NM_006033	2,45
<i>DUPD1</i>	NM_001003892	2,42
<i>CFAP61</i>	NM_015585	2,41
<i>METTL7B</i>	NM_152637	2,33
<i>CXCL17</i>	NM_198477	2,24

Gen-Symbol	RefSeqAccession-Nummer	<i>fold change:</i> miR-34a-5p vs. ANC
<i>RAB30</i>	NM_014488	2,23
<i>ARHGEF39</i>	NM_032818	2,22
<i>UQCRB</i>	NM_001254752	2,21
<i>CETP</i>	NM_000078	2,15
<i>LTF</i>	NM_002343	2,06
<i>AOX1</i>	NM_001159	2,05
<i>RSPO4</i>	NM_001029871	2,05

Im nächsten Schritt wurden die 480 mRNAs mit mindestens 1,5-fachem *fold change* biochemischen *pathways* (Signalwegen) zugeordnet. Hierfür wurde eine over-Representation-Analyse mit der bioinformatischen Software GeneTrail 3.0 durchgeführt. Die veränderten mRNAs konnten in 140 signifikante Signalwege aus der *gene ontology* (GO)-Kategorie „*biological process*“ sowie in 12 Signalwege der Gruppe „*molecular function*“ eingeordnet werden. Bei genauerer Betrachtung der identifizierten Signalwege zeigte sich insbesondere eine Häufung der im Microarray reprimierten mRNAs in Signalwegen, welche mit Zytokinfunktionen assoziiert sind. In der Kategorie „*molecular function*“ waren die fünf am signifikantesten veränderten Signalwege „*cytokine activity*“, „*cytokine receptor binding*“, „*receptor ligand activity*“, „*signaling receptor activator activity*“ und „*type I interferon receptor binding*“ (alle p-Wert ≤ 0.001). Die Ergebnisse der over-Representation-Analyse sind in Abbildung 10 dargestellt.

A

GO_Biological_Process

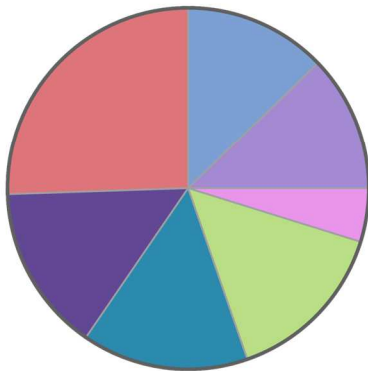


- defense response to virus
- response to external biotic stimulus
- defense response
- response to virus
- defense response to other organism
- response to other organism
- cell surface receptor signaling pathway
- type I interferon signaling pathway
- immune response
- regulation of immune system process
- immune system process

gesamt=549

B

GO_Molecular_Function



- cytokine activity
- cytokine receptor binding
- type I interferon receptor binding
- receptor ligand activity
- receptor regulator activity
- signaling receptor activator activity
- signaling receptor binding

gesamt=288

Abbildung 10: Ergebnisse der over-Representation-Analyse. Bei der over-Representation-Analyse, die mit GeneTrail 3.0 durchgeführt wurde, zeigten sich 140 signifikante Signalwege, die der GO-Kategorie „*biological process*“ zugeordnet werden konnten, sowie 12 signifikante Signalwege aus der Kategorie „*molecular function*“. In (A) sind die 20 Signalwege mit der höchsten Signifikanz der Kategorie „*biological process*“ dargestellt. In der Größe des jeweiligen Segments spiegelt sich die Anzahl der an diesem Signalweg beteiligten verändert exprimierten mRNAs wider. In (B) sind die am stärksten signifikanten Signalwege der „*molecular function*“-Kategorie nach demselben Prinzip dargestellt.

Um mögliche funktionelle Protein-Interaktionen zu identifizieren, wurde mithilfe der STRING-Datenbank eine Protein-Netzwerk-Analyse durchgeführt (VON MERING et al., 2003). Hierfür wurden die entsprechenden Proteine der 20 am stärksten hoch- bzw. herunterregulierten mRNAs ausgewählt, als *interaction score* wurde ≥ 0.4 angegeben. Hierbei zeigte sich ein Interaktionsnetzwerk zwischen den Proteinen der herunterregulierten mRNAs *CXCL10*, *CXCL11*, *IL6*, *IFNA4*, *IFNA16*, *IFNB1* und *INFL1*. Zwischen den Proteinen der hochregulierten mRNAs

war hingegen kein funktioneller Zusammenhang zu erkennen. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Protein-Netzwerk-Analyse.

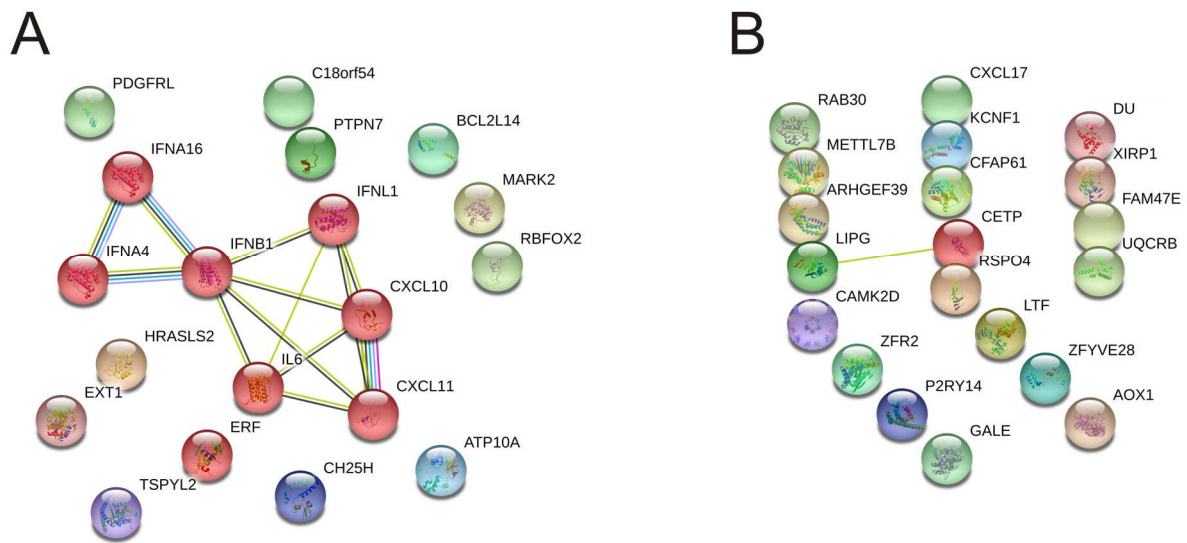


Abbildung 11: Ergebnisse der Protein-Netzwerk-Analyse. Die Proteine der im mRNA-Microarray 20 am stärksten hoch- und herunterregulierten mRNAs wurden mit der String-Datenbank abgeglichen. Des Weiteren wurde ein *interaction score* >0,4 eingestellt. (A) zeigt die grafische Abbildung des hieraus resultierenden Interaktionswerks der Proteine der herunterregulierten mRNAs. (B) Im Gegensatz hierzu sieht man bei den Proteinen der hochregulierten mRNAs nur eine Interaktion zwischen LIPG und CAMK2D.

6.2 Dual-Luciferase-Reporter-Assays

Um zu entscheiden, welche potenziellen Zielgene der miR-34a-5p im Rahmen dieser Arbeit in Dual-Luciferase-Reporter-Assays getestet werden sollten, wurden bioinformatische Analysen durchgeführt. Dieser Selektionsvorgang ist in Abbildung 12 bildlich veranschaulicht.

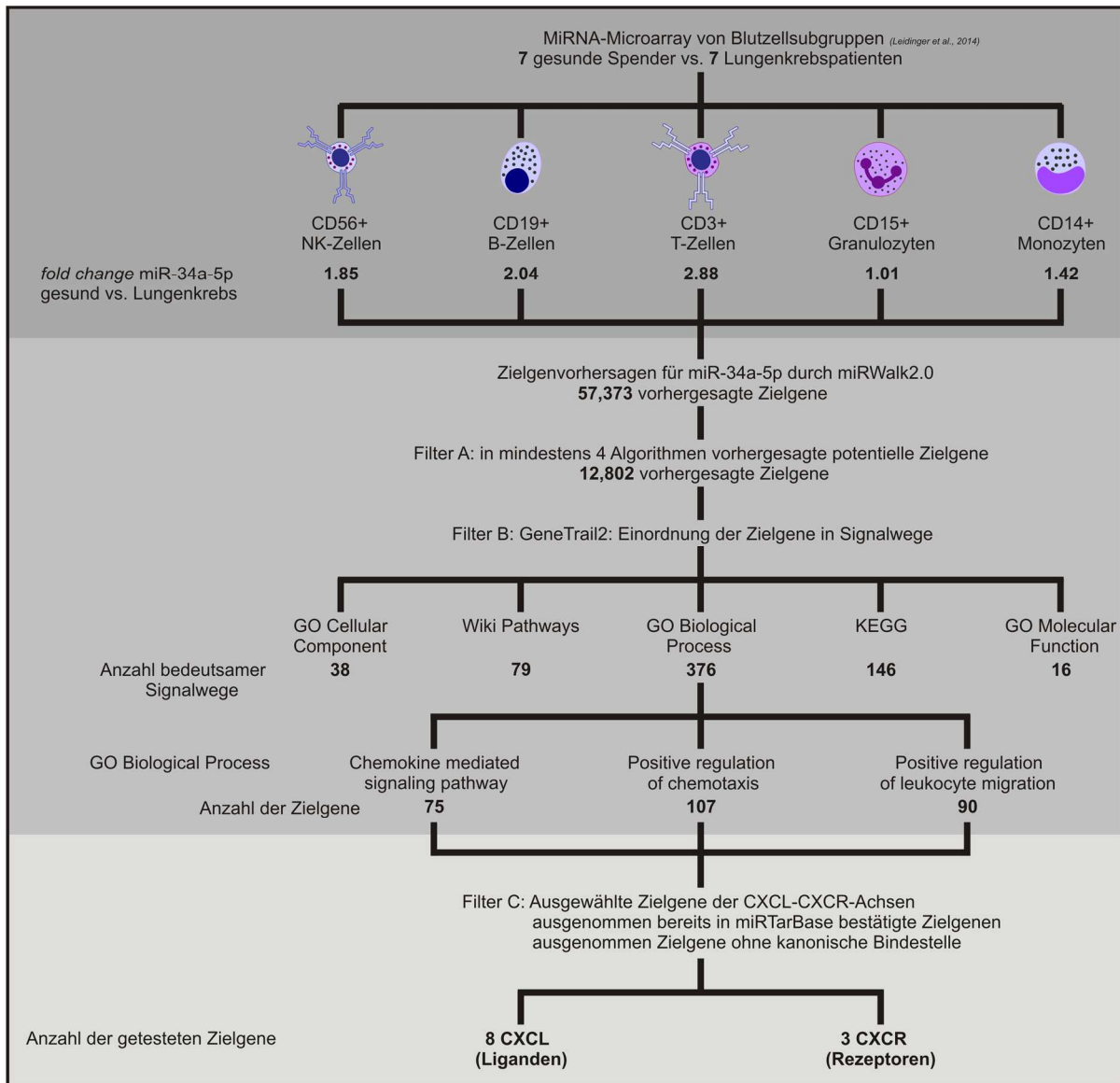


Abbildung 12: Herangehensweise bei der Selektion der CXC-Chemokinfamilie zur Untersuchung auf Zielgene der miR-34a-5p. Zu Beginn stand die Identifizierung der Expression der miR-34a-5p in mehreren Immunzellsubsets von Lungenkrebspatienten (HART et al., 2016; LEIDINGER et al., 2014). Daraufhin wurde eine Zielgenvorhersage für die miR-34a-5p mittels miRWalk 2.0 durchgeführt. Es wurden 57.373 potenzielle Zielgene identifiziert. Um die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Zielgenvorhersage zu erhöhen, wurde mit GeneTrail 2.0 eine Enrichment-Analyse durchgeführt und 12.802 Zielgene, die von mindestens 4 Algorithmen vorhergesagt wurden, selektiert. Mittels GeneTrail 2.0 wurden diese potenziellen Zielgene in verschiedene GO-Kategorien eingeordnet. Bei genauerer Betrachtung der Signalwege konnte eine Häufung von Signalwegen, die mit Zytokinfunktionen, insbesondere mit Zielgenen aus der CXC-Chemokinfamilie assoziiert sind, identifiziert werden. Laut miRTarBase bereits bestätigte Zielgene sowie vorhergesagte Zielgene ohne potenzielle miR-34a-5p-Bindestelle in der 3'UTR wurden ausgeschlossen. Insgesamt fanden sich 8 CXC-Liganden sowie 3 CXC-Rezeptoren, die diesen Kriterien entsprachen und somit für die Zielgenidentifizierung mittels Dual-Luciferase-Assay ausgewählt wurden.

Mittels miRWalk 2.0, einem bioinformatischen Tool, welches zur miR-Zielgen-Vorhersage mehrere Algorithmen zusammenfasst, wurden Zielgenvorhersagen für die miR-34a-5p durchgeführt. Die dabei entstandene Liste von 57.373 potenziellen miR-34a-5p-Zielgenen wurde verwendet, um mit Hilfe von GeneTrail 2.0 eine Enrichment-Analyse dieser vorhergesagten Zielgene durchzuführen. Es wurden hierbei nur die 12.802 Zielgene berücksichtigt, die von mindestens 4 verschiedenen Algorithmen vorausgesagt wurden. Dabei zeigten sich relevante

Signalwege in den Kategorien „*GO biological process*“ (376), „*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*“ (146), „*Wiki Pathways*“ (79), „*GO Cellular Component*“ (38) und „*GO Molecular Function*“ (16). Es zeigte sich eine Anhäufung der miR-34a-5p-Zielgene in dem KEGG-Signalweg „*cytokine-cytokine receptor interaction*“, auch in der Kategorie „*GO biological process*“ lagen 107 potenzielle Zielgene in „*positive regulation of chemotaxis*“ vor, 90 Zielgene in „*positive regulation of leukocyte migration*“ sowie 75 Zielgene in dem „*chemokine mediated signaling pathway*“ konnten ebenfalls identifiziert werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Microarrays wurde die Gruppe der CXC-Chemokine zur funktionellen Analyse ausgewählt, bereits bestätigte Zielgene sowie vorhergesagte Zielgene ohne potenzielle miR-34a-5p-Bindestelle in der 3'UTR wurden ausgeschlossen. Es wurden die 3'UTRS von 3 CXC-Chemokinrezeptoren, *CXCR1*, *CXCR2* und *CXCR3*, sowie von 8 CXC-Liganden, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL5*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL12*, *CXCL14* und *CXCL16*, zur Analyse mittels Dual-Luciferase-Assay ausgewählt.

Um in Dual-Luciferase-Assays zu testen, ob die miR-34a-5p tatsächlich an eine vorhergesagte Bindestelle bindet, wurde ein möglichst großer Teil der 3'UTR in ein pMIR-Reporterplasmid kloniert, um etwaige Effekte in der Sekundärstruktur der 3'UTR berücksichtigen zu können. Da sich die MCS des pMIR-RNL-TK direkt am 3'-Ende des Firefly-Luciferasegens befindet, steht die Translation der Firefly-Luciferase-mRNA unter der Kontrolle der fremdeingebrachten 3'UTR. Eine Bindung der miR-34a-5p an die 3'UTR führt zu einer Reduktion der Luciferase-expression, wodurch eine geringere Firefly-Luciferase-Aktivität bei miR-34a-5p-Überexpression gemessen wird. Zudem enthält der pMIR-RNL-TK-Vektor ein Renilla-Luciferasegen, welches konstitutiv exprimiert wird und der Normierung der Transfektionseffizienz dient. Des Weiteren wird für die Dual-Luciferase-Assays ein Expressionsplasmid (pSG5) benötigt, welches den miR-34a-5p-Vorläufer sowie zusätzliche 100 bp sowohl 3' als auch 5' dessen enthält und bei Transfektion in HEK293T-Zellen eine Überexpression der miR-34a-5p ermöglicht. Zur Durchführung der Dual-Luciferase-Assays wurden HEK293T-Zellen als Kontrolle mit 0,8 µg miR-34a-5p-Expressions- sowie 0,2 µg Reportervektor kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 48 h lysiert, anschließend wurde die Luciferaseaktivität der jeweiligen Ansätze mit Hilfe eines Luminometers gemessen. Die Dual-Luciferase-Assays wurden in vier unabhängigen Experimenten in Duplikaten durchgeführt. Die Luciferase-Aktivität in den Ansätzen, die entweder mit leerem Reportervektor oder mit Reportervektor mit zu testender 3'UTR, sowie mit leerem Expressionsplasmid kotransfiziert wurden, wurde als 100% definiert und die Luciferase-Aktivität von Ansätzen, welche mit leerem Reportervektor bzw. mit Reportervektor mit zu testender 3'UTR, sowie mit miR-34a-5p-Expressionsplasmid transfiziert wurden, dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Bindung der miR-34a-5p an die vorausgesagte Bindestelle in der 3'UTR des jeweiligen Zielgens sollte zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität durch Inhibition der Translation oder dem Abbau der Firefly-Luciferase-mRNA führen. Um zu

validieren, dass die Bindung der miRNA-Seedsequenz an die vorhergesagte Bindestelle ursächlich für eine Reduktion der Luciferaseaktivität war, wurde die Nukleotidsequenz der Bindestelle mutiert. Bei Fehlen der Bindestelle sollte keine signifikante Veränderung der Luciferaseaktivität mehr nachweisbar sein.

6.2.1 **Negativ getestete Zielgene**

Bei der Untersuchung der CXC-Familie auf eine mögliche Regulation durch die miR-34a-5p mithilfe von Dual-Luciferase-Assays zeigte sich für zwei CXC-Rezeptoren und drei CXC-Chemokinliganden kein signifikanter Effekt auf die Luciferaseaktivität der jeweiligen Reporter-konstrukte durch eine miR-34a-5p-Überexpression.

6.2.1.1 **Negativ getestete CXC-Rezeptoren**

Bei einer Kotransfektion des Reporterplasmids mit *CXCR1*-3'UTR und einem miR-34a-5p-pSG5-Expressionsplasmid führte die miR-34a-5p-Überexpression zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität auf 80,1 %. Die Luciferaseaktivität der Kontrolltransfektion mit Leervektor und miR-34a-5p-Expressionsvektor zeigte eine Luciferaseaktivität von 97,8 %. Die Differenz zwischen den Luciferase-Aktivitäten dieser beiden Messansätze erwies sich als statistisch schwach signifikant ($p=0,02$), weshalb die *CXCR1*-Bindestelle mutiert wurde und erneute Dual-Luciferase-Assays mit Leervektor, *CXCR1*-3'UTR- und *CXCR1*-mut-3'UTR-Reporterplasmiden durchgeführt wurden. Bei der wiederholten Durchführung zeigte sich bei miR-34a-5p-Überexpression eine relative Luciferaseaktivität von 80,7 % des *CXCR1*-3'UTR-Konstrukts sowie von 88,3 % der pMIR-RNL-TK-Leervektorkontrolle. Dieser Unterschied erwies sich nicht mehr als statistisch signifikant ($p=0,059$), sodass *CXCR1* nicht als Zielgen der miR-34a-5p bestätigt werden konnte. Auch die Kotransfektion von pMIR-*CXCR2* und miR-34a-5p führte zu keiner signifikanten Reduktion der Luciferaseaktivität (82,4 %) im Vergleich zu den Kontrollkotransfektionen mit pSG5-miR-34a-5p und leerem Reporterplasmid (83,8 %, $p=0,69$). Die in Abbildung 13 dargestellten Ergebnisse zeigen den Aufbau der *CXCR1*- (Abbildung 13 A) und *CXCR2*-3'UTR-Konstrukte (Abbildung 13 B) sowie die Ergebnisse der Dual-Luciferase-Assays.

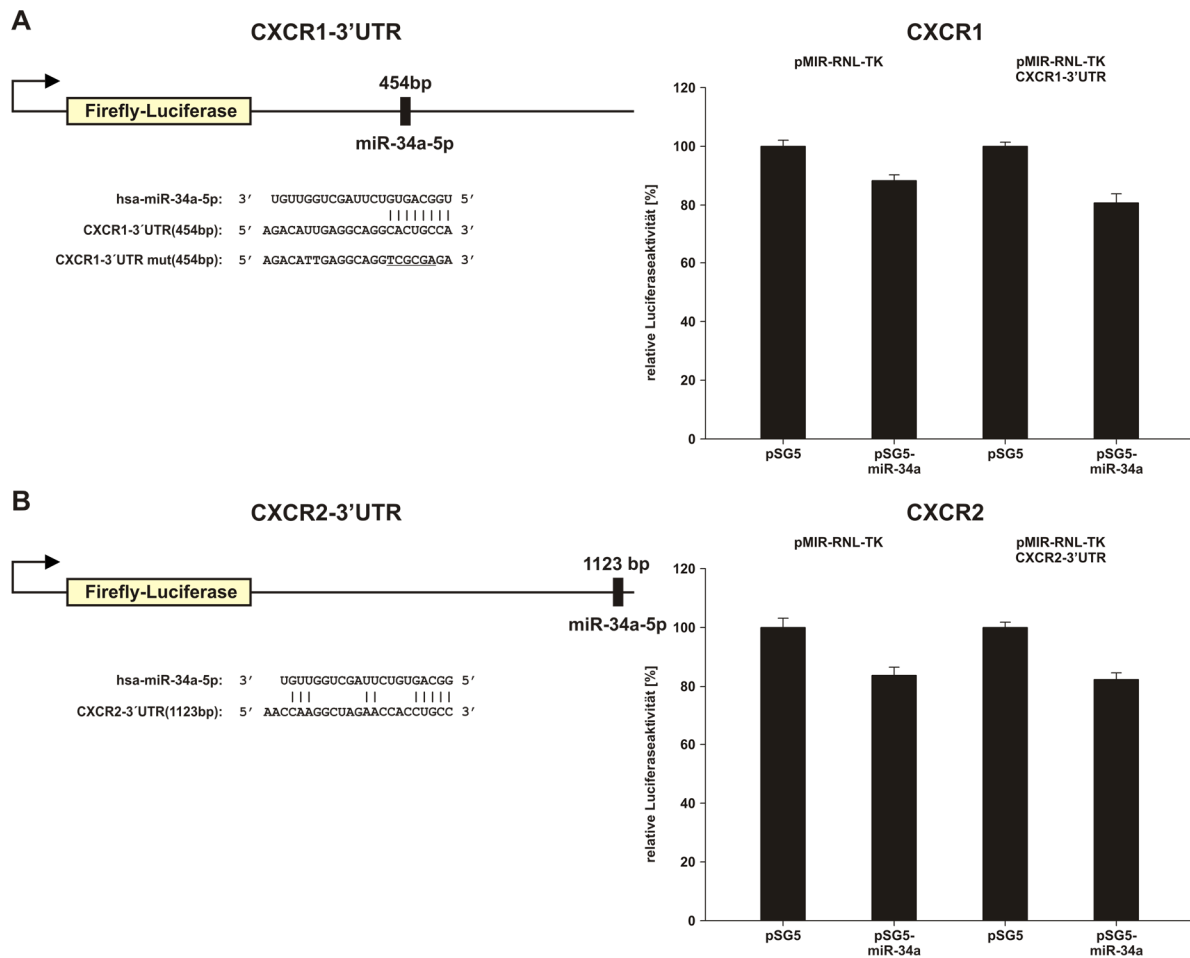


Abbildung 13: Grafische Darstellung der klonierten pMIR-RNL-TK *CXCR1*- (A) und *CXCR2*- (B) 3'UTR-Reportergernekonstrukte und Ergebnissen der Dual-Luciferase-Reporter-Assays. In vier unabhängigen Experimenten wurden HEK293T-Zellen mit leerem pMIR-RNL-TK oder mit den links abgebildeten Wildtyp- oder mutierten 3'UTR-Reportergernekonstrukten transfiziert. Der Einfluss der miR-34a-5p auf die Firefly-Luciferaseaktivität der jeweiligen Reportervektoren wurde durch Kofransfektion mit miR-34a-5p- oder leerem pSG5-Expressionsplasmid untersucht. 48 h nach der Transfektion wurde die Luciferaseaktivität jeweils in Doppelansätzen pro biologischem Replikat bestimmt. Bei miR-34a-5p-Überexpression wurde die relative Firefly-Luciferaseaktivität der klonierten Reportergernekonstrukte und dem als Kontrolle fungierenden leeren Reportervektor unter Durchführung eines ungepaarten Student's T-Tests ausgewertet: Lag eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle vor und wurde dieser Effekt durch Mutation der vorhergesagten miR-34a-5p-Bindestelle aufgehoben, konnte das Zielgen bestätigt werden.

6.2.1.2 Negativ getestete CXC-Liganden

Auch die CXC-Liganden *CXCL2*, *CXCL5* und *CXCL12* konnten in den Dual-Luciferase-Assays nicht als Zielgene der miR-34a-5p bestätigt werden. In Abbildung 14 ist der Aufbau der klonierten 3'UTR-Reporterplasmide gezeigt, zudem sind die Ergebnisse der Dual-Luciferase-Assays bildlich dargestellt.

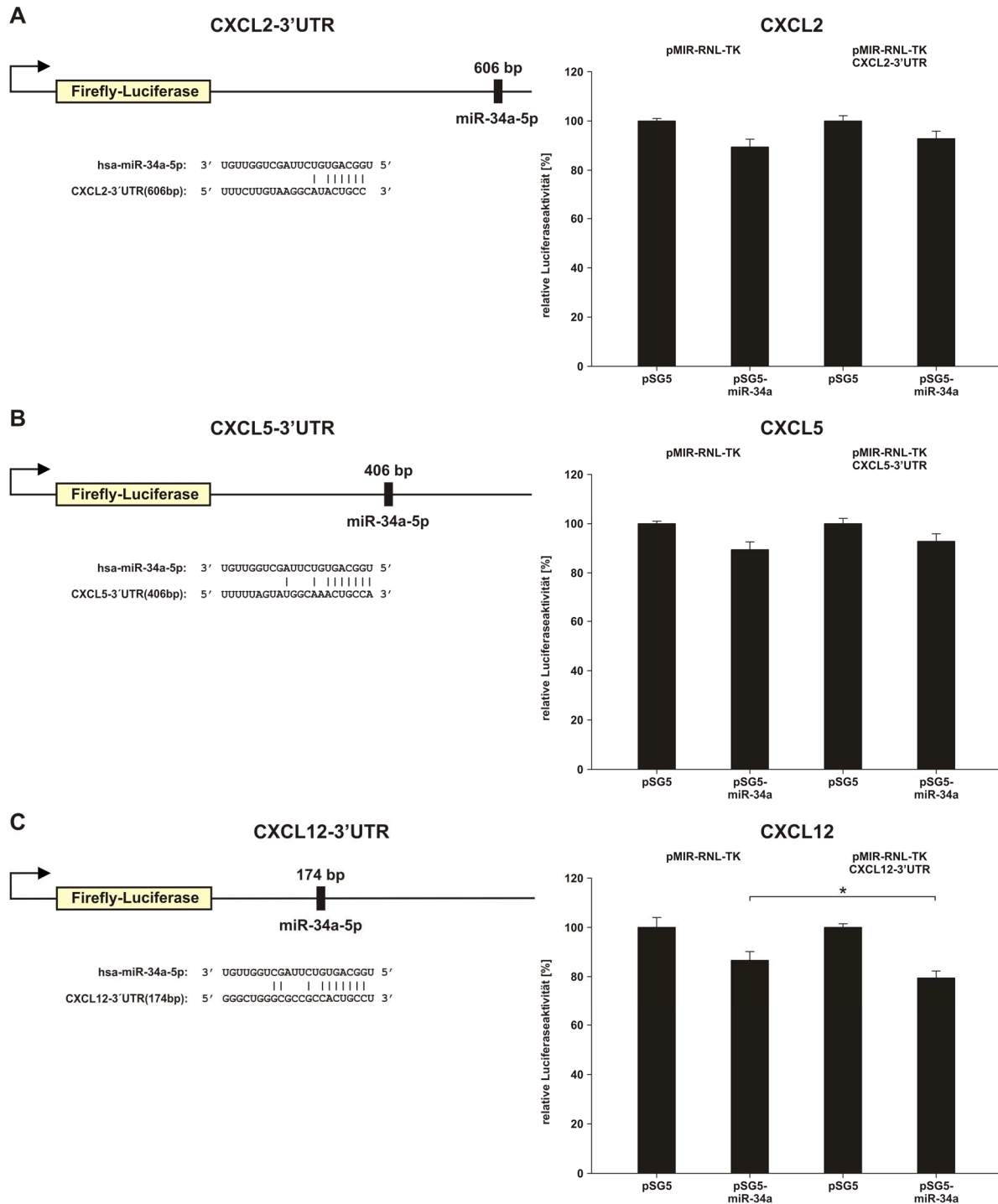


Abbildung 14: Grafische Darstellung der klonierten pMIR-RNL-TK *CXCL2*- (A), *CXCL5*- (B) und *CXCL12*- (C) 3'UTR-Reportergenkonstrukte und der Ergebnisse der Dual-Luciferase-Reporter-Assays. In vier unabhängigen Experimenten wurden HEK293T-Zellen mit leerem pMIR-RNL-TK oder mit den links abgebildeten Wildtyp- oder mutierten 3'UTR-Reportergenkonstrukten transfiziert. Der Einfluss der miR-34a-5p auf die Firefly-Luciferaseaktivität der jeweiligen Reportervektoren wurde durch Kofektion mit miR-34a-5p- oder leerem pSG5-Expressionsplasmid untersucht. 48 h nach der Transfektion wurde die Luciferaseaktivität jeweils in Doppelansätzen pro biologischem Replikat bestimmt. Bei miR-34a-5p-Überexpression wurde die relative Firefly-Luciferaseaktivität der klonierten Reportergenkonstrukte und dem als Kontrolle fungierenden leeren Reportervektor unter Durchführung eines ungepaarten Student's T-Tests ausgewertet: Lag eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle vor und wurde dieser Effekt durch Mutation der vorhergesagten miR-34a-5p-Bindestelle aufgehoben, konnte das Zielgen bestätigt werden. Signifikanzniveau: * (schwach signifikant) $p \leq 0,05$

Die Kotransfektion der HEK293T-Zellen mit *CXCL2*-3'UTR-Reporter- und miR-34a-5p-Expressionsplasmid führte zu einer relativen Luciferaseaktivität von 92,8 %. Bei einer Kontrolltransfektion mit leerem pMIR-RNL-TK-Reporterplasmid sowie miR-34a-5p-Expressionsplasmid betrug die relative Luciferaseaktivität 89,4 %. Der Unterschied in der Luciferaseaktivität zwischen 3'UTR-Reportergenkonstrukt und der Leervektor-Kontrolle erwies sich als statistisch nicht signifikant ($p = 0,45$).

Die relative Luciferaseaktivität der Reportergenkonstrukte mit *CXCL5*- und *CXCL12*-3'UTR bei miR-34a-5p-Überexpression betrug 92,8 % und 77,5 %, während die zugehörige Testung des Kontrollplasmids eine Aktivität von 88,7 % ergab. Die statistische Auswertung zeigte keine signifikante Differenz in den Luciferaseaktivitäten von Kontrolle und *CXCL5*-3'UTR-Konstrukt ($p = 0,47$). Die Reduktion der *CXCL12*-3'UTR-Konstrukte gegenüber der Kontrolle erwies sich als schwach signifikant ($p = 0,027$), aber mit 11,2 % nicht als ausgeprägt genug, um diese Interaktion durch Mutagenese zu bestätigen.

6.2.2 Positiv getestete Zielgene

Bei der Durchführung der Dual-Luciferase-Experimente zeigte sich bei einem CXC-Rezeptor sowie bei fünf CXC-Liganden eine signifikante Reduktion der Luciferaseexpression bei Transfektion des jeweiligen pMIR-RNL-TK-3'UTR-Konstrukts und zeitgleicher miR-34a-5p-Überexpression. Auf die genauen Messergebnisse sowie die jeweiligen Signifikanzniveaus wird im Folgenden genauer eingegangen.

6.2.2.1 Positiv getestete CXC-Rezeptoren

Der CXCR3-Chemokinrezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor der Klasse A (MURPHY, 1994), der von IFN- γ induziert wird (NAKAJIMA et al., 2002). Er wird insbesondere auf CD4⁺-Zellen vom T-Helfer-1(T_H1)-Typ (BONECCHI et al., 1998), CTLs, natürlichen Killerzellen sowie auf natürlichen Killer-T-Zellen, plasmazytoiden dendritische Zellen und Endothelzellen exprimiert (BAILEY et al., 2014; CELLA et al., 1999; LOETSCHER et al., 1996; QIN et al., 1998). An CXCR3 binden CXCL9, CXCL10 sowie CXCL11, auch bindet CXCL4 an manche Isoformen des CXCR3-Rezeptors (LASAGNI et al., 2003; MUELLER et al., 2008). Ein Schema des CXCR3-3'UTR-Reportergenkonstrukts sowie die im Dual-Luciferase-Assay erhobenen Messergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

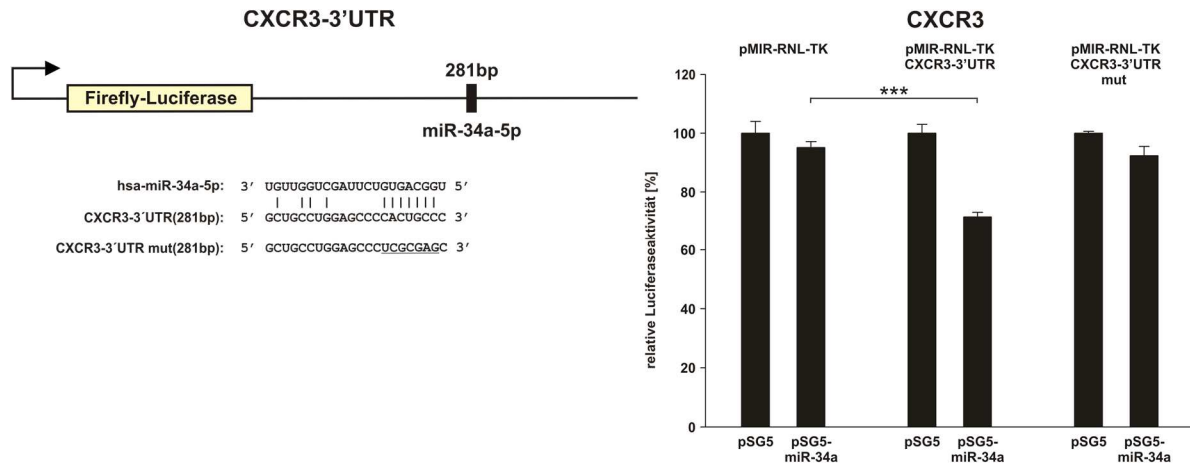


Abbildung 15: Grafische Darstellung des klonierten pMIR-RNL-TK CXCR3- (A) 3'UTR-Reportergenkonstrukts und der Ergebnisse des Dual-Luciferase-Reporter-Assays. In vier unabhängigen Experimenten wurden HEK293T-Zellen mit leerem pMIR-RNL-TK oder mit den links abgebildeten Wildtyp- oder mutierten 3'UTR-Reportergenkonstrukten transfiziert. Der Einfluss der miR-34a-5p auf die Firefly-Luciferaseaktivität der jeweiligen Reportervektoren wurde durch Kotransfektion mit miR-34a-5p- oder leerem pSG5-Expressionsplasmid untersucht. 48 h nach der Transfektion wurde die Luciferaseaktivität jeweils in Doppelansätzen pro biologischem Replikat bestimmt. Bei miR-34a-5p-Überexpression wurde die relative Firefly-Luciferaseaktivität der klonierten Reportergenkonstrukte und dem als Kontrolle fungierenden leeren Reportervektor unter Durchführung eines ungepaarten Student's T-Tests ausgewertet: Lag eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle vor und wurde dieser Effekt durch Mutation der vorhergesagten miR-34a-5p-Bindestelle aufgehoben, konnte das Zielgen bestätigt werden. Signifikanzniveau: ***(hoch signifikant) $p \leq 0,001$

Bei miR-34a-5p-Überexpression betrug die relative Luciferaseaktivität des *CXCR3*-3'UTR-Plasmids 71,4 %, die des Reporterplasmidkonstrukts mit mutierter potenzieller miR-34a-5p-Bindestelle in der *CXCR3*-3'UTR 92,3% und die des leeren Kontrollvektors 95,1 %. Die Differenz der Luciferaseaktivitäten zur Kontrolle erwies sich für das *CXCR3*-3'UTR-Konstrukt mit $p = 2,60 \times 10^{-7}$, jedoch nicht für das *CXCR3* mut-3'UTR-Reporterplasmid mit $p = 0,48$, als statistisch signifikant. Somit konnte die Bindung der miR-34a-5p an die *CXCR3*-3'UTR bestätigt werden.

6.2.2.2 Positiv getestete CXCL-Liganden

6.2.2.2.1 CXCL1

CXCL1 ist ein Ligand von CXCR2 und wird von Makrophagen, Monozyten, Epithel- und Endothelzellen sowie von Tumorzellen sezerniert (BECKER et al., 1994; HASKILL et al., 1990; LO et al., 2013). CXCL1 wirkt über CXCR2 unter anderem proangiogenetisch und fördert so die Tumervaskularisierung und Metastasierung (ADDISON et al., 2000). Bemerkenswerterweise ist die Aminosäuresequenz von CXCL1 zu 90 % mit CXCL2 identisch (HASKILL et al., 1990; IIDA, GROTENDORST, 1990). In Abbildung 16 sind die Ergebnisse des Dual-Luciferase-Assays sowie eine schematische Darstellung des klonierten pMIR-RNL-TK *CXCL1*-3'UTR-Reportervektors dargestellt.

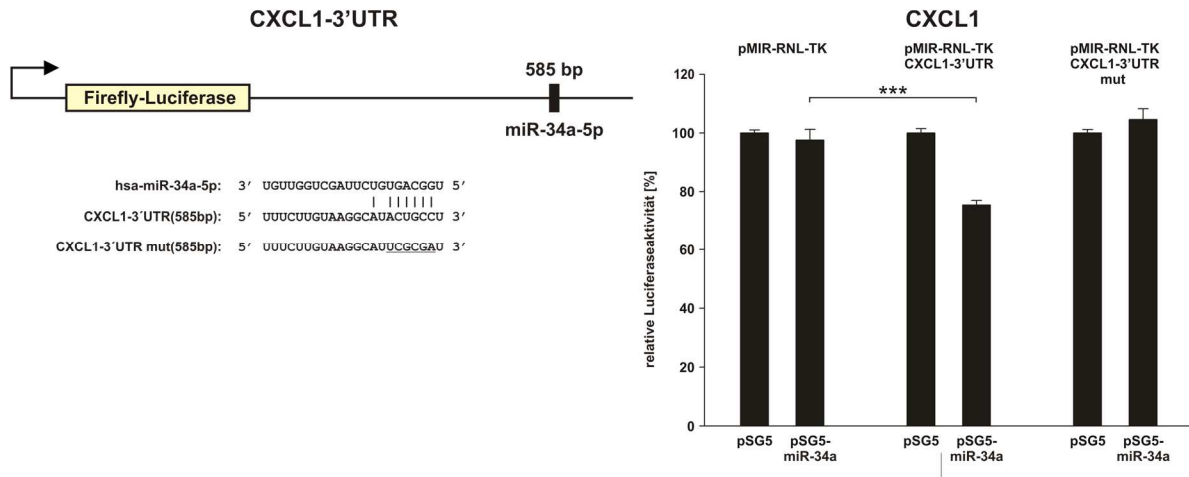


Abbildung 16: Grafische Darstellung des klonierten pMIR-RNL-TK *CXCL1*- (A) 3'UTR-Reportergenkonstrukts und der Ergebnisse des Dual-Luciferase-Reporter-Assays. In vier unabhängigen Experimenten wurden HEK293T-Zellen mit leerem pMIR-RNL-TK oder mit den links abgebildeten Wildtyp- oder mutierten 3'UTR-Reportergenkonstrukten transfiziert. Der Einfluss der miR-34a-5p auf die Firefly-Luciferaseaktivität der jeweiligen Reportervektoren wurde durch Kotransfektion mit miR-34a-5p- oder leerem pSG5- Expressionsplasmid untersucht. 48 h nach der Transfektion wurde die Luciferaseaktivität jeweils in Doppelansätzen pro biologischem Replikat bestimmt. Bei miR-34a-5p-Überexpression wurde die relative Firefly-Luciferaseaktivität der klonierten Reportergenkonstrukte und dem als Kontrolle fungierenden leeren Reportervektor unter Durchführung eines ungepaarten Student's T-Tests ausgewertet: Lag eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle vor und wurde dieser Effekt durch Mutation der vorhergesagten miR-34a-5p-Bindestelle aufgehoben, konnte das Zielgen bestätigt werden. Signifikanzniveau: ***(hoch signifikant) $p \leq 0,001$

Im Dual-Luciferase-Assay konnte *CXCL1* als direktes Zielgen der miR-34a-5p identifiziert werden. Bei miR-34a-5p-Überexpression konnte bei der Testung des *CXCL1*-3'UTR-Reportergenkonstrukts eine relative Luciferaseaktivität von 75,4 % gemessen werden, dies stellt eine mit dem p-Wert von $p = 7,4 \times 10^{-5}$ statistisch signifikante Differenz zur Luciferaseaktivität (97,5 %) der Leervektorkontrolle dar. Im Gegensatz zu diesem Silencingeffekt änderte sich die Luciferaseaktivität des Reporterplasmidkonstrukts mit mutierter Bindestelle *CXCL1* mut-3'UTR mit 104,6 % im Vergleich zur Kontrolle nicht statistisch signifikant ($p = 0,2$).

6.2.2.2.2 *CXCL10* und *CXCL11*

CXCL10 und *CXCL11* fungieren als Liganden des ebenfalls als Zielgen bestätigten CXCR3 (COLE et al., 1998; LASAGNI et al., 2003). Sezerniert werden *CXCL10* und *CXCL11* von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, sowie von Tumorzellen (COLE et al., 1998; HUMAN PROTEIN ATLAS, 2006, 2017; LUSTER, RAVETCH, 1987; MACH et al., 1999; MUTHUSWAMY et al., 2008; OHMORI et al., 1997; OHMORI et al., 1993; UHLÉN et al., 2015)). IFN- γ ist der Hauptinduktor der *CXCL10*- und *CXCL11*-Expression (QIAN et al., 2007; RANI et al., 1996). Sowohl *CXCL10* als auch *CXCL11* wurden mittels Dual-Luciferase-Assay auf eine Regulation durch die miR-34a-5p untersucht. Der Aufbau der pMIR-RNL-TK-Reporterplasmide sowie die Messergebnisse der jeweiligen Dual-Luciferase-Assays sind in Abbildung 17 dargestellt.

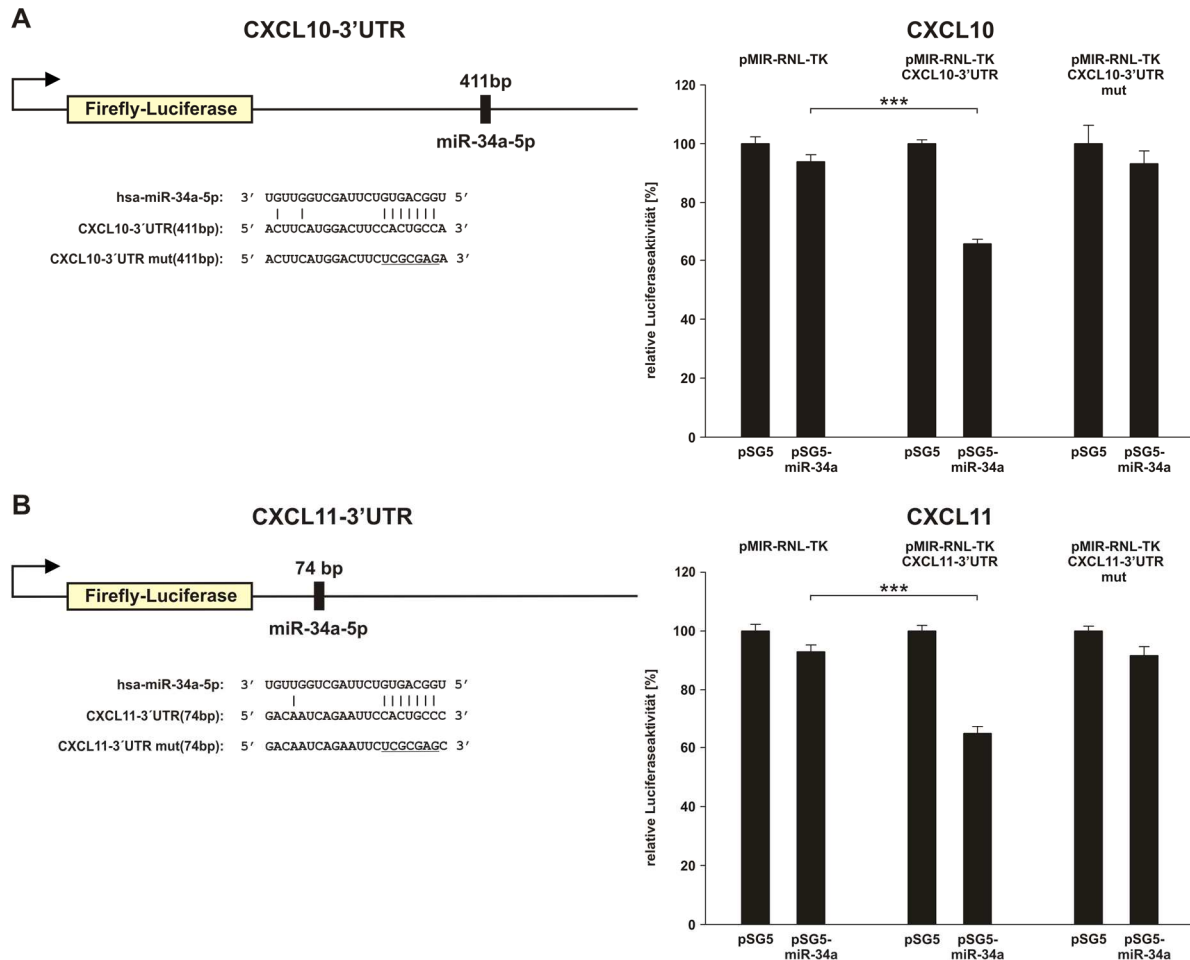


Abbildung 17: Grafische Darstellung der klonierten pMIR-RNL-TK *CXCL10*- (A) und *CXCL11*- (B) 3'UTR-Reportergenkonstrukte und der Ergebnisse der Dual-Luciferase-Reporter-Assays. In vier unabhängigen Experimenten wurden HEK293T-Zellen mit leerem pMIR-RNL-TK oder mit den links abgebildeten Wildtyp- oder mutierten 3'UTR- Reportergenkonstrukten transfiziert. Der Einfluss der miR-34a-5p auf die Firefly-Luciferaseaktivität der jeweiligen Reportervektoren wurde durch Kotransfektion mit miR-34a-5p- oder leerem pSG5-Expressionplasmid untersucht. 48 h nach der Transfektion wurde die Luciferaseaktivität jeweils in Doppelansätzen pro biologischem Replikat bestimmt. Bei miR-34a-5p-Überexpression wurde die relative Firefly-Luciferaseaktivität der klonierten Reportergenkonstrukte und dem als Kontrolle fungierenden leeren Reportervektor unter Durchführung eines ungepaarten Student's T-Tests ausgewertet: Lag eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle vor und wurde dieser Effekt durch Mutation der vorhergesagten miR-34a-5p-Bindestelle aufgehoben, konnte das Zielgen bestätigt werden. Signifikanzniveau: ***(hoch signifikant) $p \leq 0,001$

Im Assay betrug die bei miR-34a-5p-Überexpression detektierte relative Luciferaseaktivität des *CXCL10*-Reporterkonstrukts 65,5 %, die des *CXCL10* mut-3'UTR-Reporterkonstrukts 93,1 % sowie die des leeren pMIR-RNL-TK-Kontrollvektors 93,9 %. Der statistische Vergleich zeigte eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität ($p = 2,2 \times 10^{-7}$) für die wildtypische *CXCL10*-3'UTR im Vergleich zur Kontrolle, jedoch nicht für die mutierte *CXCL10*-3'UTR-Sequenz ($p = 0,89$), womit die Spezifität der posttranskriptionellen Repression für die vorhergesagte Bindestelle gezeigt werden konnte.

Die relative Luciferaseaktivität bei miR-34a-5p-Überexpression und pMIR-RNL-TK-*CXCL11*-3'UTR betrug 64,8 %, die Aktivität der Kontrolle mit leerem Reporterplasmid 92,9 %. Hieraus ergab sich eine hochsignifikante Reduktion der Luciferaseaktivität ($p = 7,6 \times 10^{-7}$), während bei

miR-34a-5p-Überexpression und mutierter miR-34a-5p-Bindestelle in der 3'UTR des Reportervektors (*CXCL11* mut) eine relative Luciferaseaktivität von 91,6 % gemessen wurde, welche zur Kontrolle keine signifikante Differenz aufwies ($p = 0,74$). Somit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl *CXCL10* als auch *CXCL11* Zielgene der miR-34-5p sind.

6.2.2.2.3 CXCL14

Die Dual-Luciferase-Assays konnten zudem CXCL14 als direktes Zielgen der miR-34a-5p bestätigen. CXCL14 bindet möglicherweise allosterisch an CXCR4 (COLLINS et al., 2017; HARA, TANEGASHIMA, 2014; OTTE et al., 2014). CXCL14 wird von den meisten Körpergeweben exprimiert, fehlt jedoch in vielen Tumorzelllinien (HROMAS et al., 1999). CXCL14 wird im Rahmen von Entzündungsreaktionen herunterreguliert (MAERKI et al., 2009). In Abbildung 18 sind die in den pMIR-RNL-TK-Vektor klonierte *CXCL14*-3'UTR-Sequenz einschließlich der vorhergesagten Bindestelle sowie die Ergebnisse des Dual-Luciferase-Assays grafisch dargestellt.

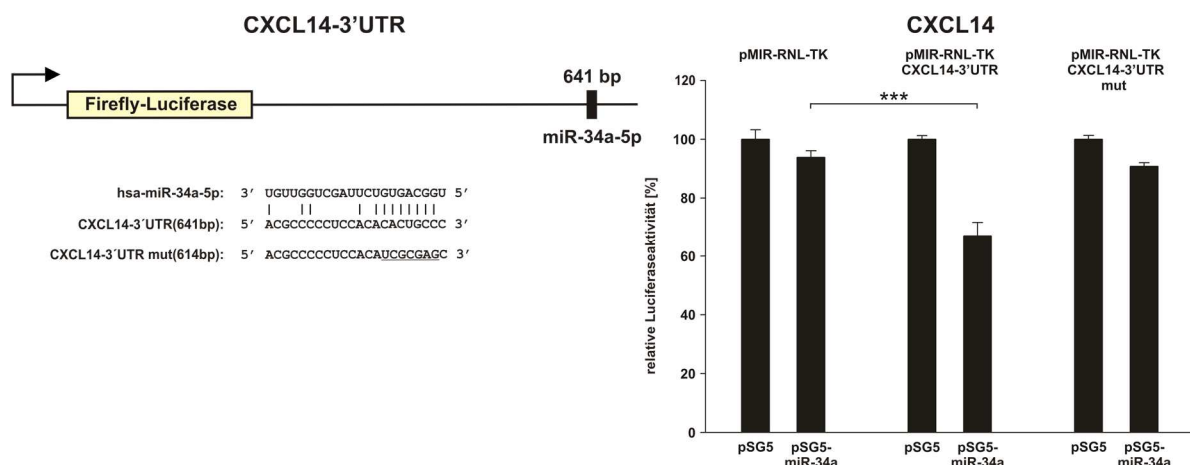


Abbildung 18: Grafische Darstellung des klonierten pMIR-RNL-TK *CXCL14*- (A) 3'UTR-Reportergenkonstrukts und der Ergebnisse des Dual-Luciferase-Reporter-Assays. In vier unabhängigen Experimenten wurden HEK293T-Zellen mit leerem pMIR-RNL-TK oder mit den links abgebildeten Wildtyp- oder mutierten 3'UTR-Reportergenkonstrukten transfiziert. Der Einfluss der miR-34a-5p auf die Firefly-Luciferaseaktivität der jeweiligen Reportervektoren wurde durch Kotransfektion mit miR-34a-5p- oder leerem pSG5-Expressionsplasmid untersucht. 48 h nach der Transfektion wurde die Luciferaseaktivität jeweils in Doppelansätzen pro biologischem Replikat bestimmt. Bei miR-34a-5p-Überexpression wurde die relative Firefly-Luciferaseaktivität der klonierten Reportergenkonstrukte und dem als Kontrolle fungierenden leeren Reportervektor unter Durchführung eines ungepaarten Student's T-Tests ausgewertet: Lag eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle vor und wurde dieser Effekt durch Mutation der vorhergesagten miR-34a-5p-Bindestelle aufgehoben, konnte das Zielgen bestätigt werden. Signifikanzniveau: ***(hoch signifikant) $p \leq 0,001$

Bei miR-34a-5p-Überexpression zeigte sich für den *CXCL14*-3'UTR-Reportervektor eine im Vergleich zur Kontrolle (93,8 %) statistisch hochsignifikante Reduktion der relativen Luciferaseaktivität auf 67,1 % ($p = 1,3 \times 10^{-4}$). Wurde die relative Luciferaseaktivität nach Transfektion mit Reporterplasmiden mit mutierter Bindestelle getestet, konnte keine signifikante

Reduktion der Luciferaseaktivität mehr verzeichnet werden (90,8 %) ($p = 0,26$), wo-durch die Abhängigkeit der posttranskriptionellen Repression von dem Vorhandensein der vorhergesagten miR-34a-5p-Bindestelle bestätigt wurde.

6.2.2.2.4 CXCL16

CXCL16 liegt sowohl in freier Form als auch mit einer Transmembrandomäne an die Zellwand gebunden vor (ABEL et al., 2004; SHIMAOKA et al., 2004). CXCL16 ist auf dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert (MATLOUBIAN et al., 2000; WILBANKS et al., 2001), CXCL16 bindet an CXCR6 (MATLOUBIAN et al., 2000). Abbildung 19 zeigt den schematischen Aufbau der pMIR-RNL-TK-CXCL16-3'UTR-Plasmide sowie die Ergebnisse des Dual-Luciferase-Assays.

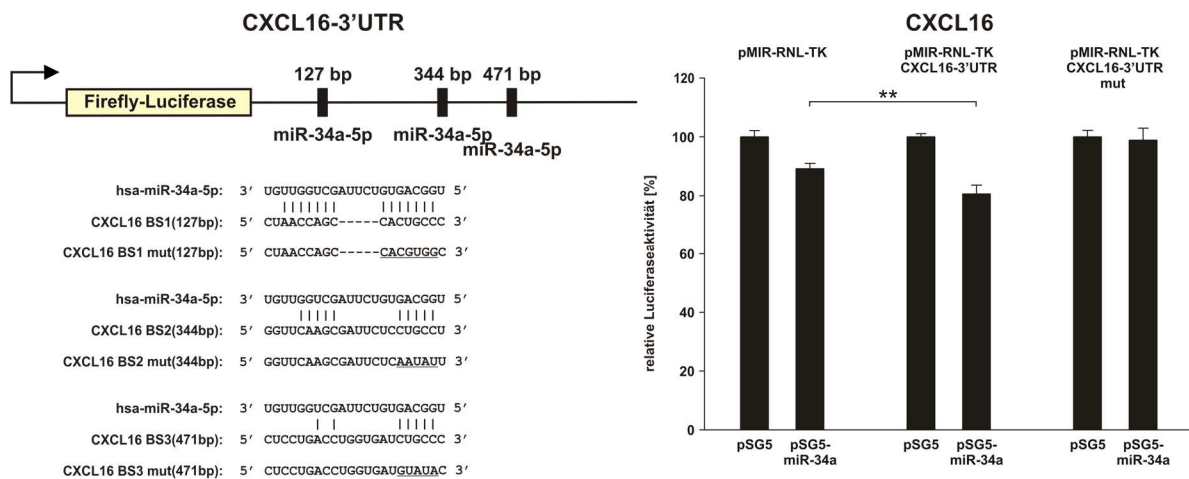


Abbildung 19: Grafische Darstellung des klonierten pMIR-RNL-TK CXCL16- (A) 3'UTR-Reporter-genkonstrukts und der Ergebnisse des Dual-Luciferase-Reporter-Assays. In vier unabhängigen Experimenten wurden HEK293T-Zellen mit leerem pMIR-RNL-TK oder mit den links abgebildeten Wildtyp- oder mutierten 3'UTR-Reporter-genkonstrukten transfiziert. Der Einfluss der miR-34a-5p auf die Firefly-Luciferaseaktivität der jeweiligen Reportervektoren wurde durch Kotransfektion mit miR-34a-5p- oder leerem pSG5-Ex-pressionsplasmid untersucht. 48 h nach der Transfektion wurde die Luciferaseaktivität jeweils in Doppelansätzen pro biologischem Replikat bestimmt. Bei miR-34a-5p-Überexpression wurde die relative Firefly-Luciferaseaktivität der klonierten Reporter-genkonstrukte und dem als Kontrolle fungierenden leeren Reportervektor unter Durchführung eines ungeparten Student's T-Tests ausgewertet: Lag eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle vor und wurde dieser Effekt durch Mutation der vorhergesagten miR-34a-5p-Bindestelle aufgehoben, konnte das Zielgen bestätigt werden. Signifikanzniveaus: ** (signifikant) $p \leq 0,01$

In den initialen, zur Zielgenidentifizierung durchgeführten Dual-Luciferase-Assays zeigte sich die Firefly-Luciferaseaktivität des CXCL16-3'UTR-Konstrukts bei Überexpression der miR-34a-5p um 27,4 % im Vergleich zur relativen Luciferaseaktivität des Leervektors reduziert (Daten nicht gezeigt). Hierauf wurde eine Mutation der potenziellen Bindestellen der miR-34a-5p in Form eines synthetisierten Oligonukleotids durchgeführt. Bei der erneuten Luciferase-messung von CXCL16-3'UTR-Konstrukt und der Mutante zeigte sich die Aktivität des CXCL16-3'UTR-Konstrukts auf 80,5 % reduziert. Dies stellte verglichen mit der relativen Aktivität von

89,2 % in der Leervektorkontrolle einen mit $p = 0,0096$ statistisch signifikanten Effekt dar, der durch Mutation der vorhergesagten miR-34a-5p-Bindestellen der *CXCL16*-3'UTR aufgehoben wurde ($p = 0,40$), da in diesem Fall die Firefly-Aktivität 98,9 % betrug.

6.3 Quantitative Chemokinexpressionsanalysen

Bei Betrachtung der Chemokinrezeptoren und -liganden fällt auf, dass zwei Liganden, CXCL10 und CXCL11, des als miR-34a-5p-Zielgen identifizierten CXC-Chemokinrezeptors CXCR3 ebenfalls als Zielgene der miR-34a-5p bestätigt werden konnten (COLE et al., 1998; LASAGNI et al., 2003). Die Tatsache, dass die veränderte miR-34a-5p-Expression, die die Grundlage für diese Arbeit bildet, ebenfalls in T-Zellen sowie in Monozyten gemessen wurde, untermauerte die zentrale Rolle dieser Zielgene für die miR-34a-5p-abhängige Immunzellfunktion (HART et al., 2016; LEIDINGER et al., 2014). Daher wurde in der weiteren Arbeit der Fokus auf diese CXCR3/CXCL10/CXCL11-Achse gelegt. Weiterführend sollte die Veränderung der endogenen Chemokinexpression durch Erhöhung des intrazellulären miR-34a-5p-Niveaus validiert werden. Dazu wurden zum einen durchflusszytometrische Analysen sowie Western Blot-Analysen mit miR-34a-5p-transfizierten CD4⁺-T-Zellen durchgeführt, zum anderen wurde der Einfluss der miR-34a-5p auf die CXCL10- und CXCL11-Sekretion von M1-Makrophagen durch ELISAs quantifiziert.

6.3.1 Quantitative Analyse der CXCR3-Expression von CD4⁺-T-Zellen bei miR-34a-5p-Überexpression

CXCR3 wird unter anderem von aktivierten CD4⁺-T-Zell-Subsets exprimiert (BAILEY et al., 2014; QIN et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CXCR3-Expression von CD4⁺ T-Zellen quantifiziert. Hierfür wurden die CD4⁺-T-Zellen mittels MicroBeads aus PBMCs durch Negativselektion gewonnen und unter Verwendung von HiPerFect™ mit ANC oder miR-34a-5p-Mimic transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die 24-stündige Stimulierung der CD4⁺-T-Zellen durch PMA/Ionomycin. Nach der Stimulierung konnte mittels Durchflusszytometrie die CXCR3-Expression auf der Zell-Oberfläche der CD4⁺-T-Zellen untersucht werden. Dabei wurden je Ansatz 10⁵ Zellen gefärbt. Die restlichen Zellen wurden homogenisiert und zu Proteinextrakten verarbeitet, die für die Quantifizierung der Gesamt-CXCR3-Menge der CD4⁺-T-Zellen mittels Western Blot verwendet wurden.

6.3.1.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometriemessungen dienten zum einem der Überprüfung der Spezifität des verwendeten CXCR3-Antikörpers sowie der Quantifizierung der membranständigen CXCR3-Proteine. Von jeder Zellpopulation wurden zwei Ansätze mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt: Beiden Ansätzen wurden fluoreszierende CD4-Antikörper hinzugefügt, zusätzlich enthielt einer der Ansätze humane APC-gekoppelte CXCR3-Antikörper. Dem zweiten Ansatz wurde ein ebenfalls APC-gekoppelter, unspezifisch bindender Isotyp zugegeben, um den Effekt unspezifischer Bindungen der Antikörper herausrechnen zu können. Die Zellen wurden im Rahmen der Durchflusszytometrie-Untersuchung vereinzelt und in hoher Geschwindigkeit an einem Laser vorbeibewegt. Anhand von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wurden Zellgröße und -granularität festgehalten und intakte Zellen durch Gating selektioniert (s. Anhang, Abbildung 25). Das Laserlicht stimulierte zudem die Emission von Fluoreszenzen zweier Wellenlängen, deren Intensitäten separat gemessen wurden und die jeweilige Anzahl der CD4⁺ und/oder CXCR3⁺-Zellen, an die die Antikörper binden, proportional widerspiegelte. Die Fluoreszenzintensitäten der getageten Zellen wurden mithilfe der BD FACSDiva™-Software in Diagrammen abgebildet. Zur Beurteilung der Spezifität der Färbung der CD4⁺-T-Zellen wurde der Anteil der sich in Q1 und Q2 befindlichen Zellen an der Gesamtpopulation gemessen. Abbildung 20 zeigt die Resultate der durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen.

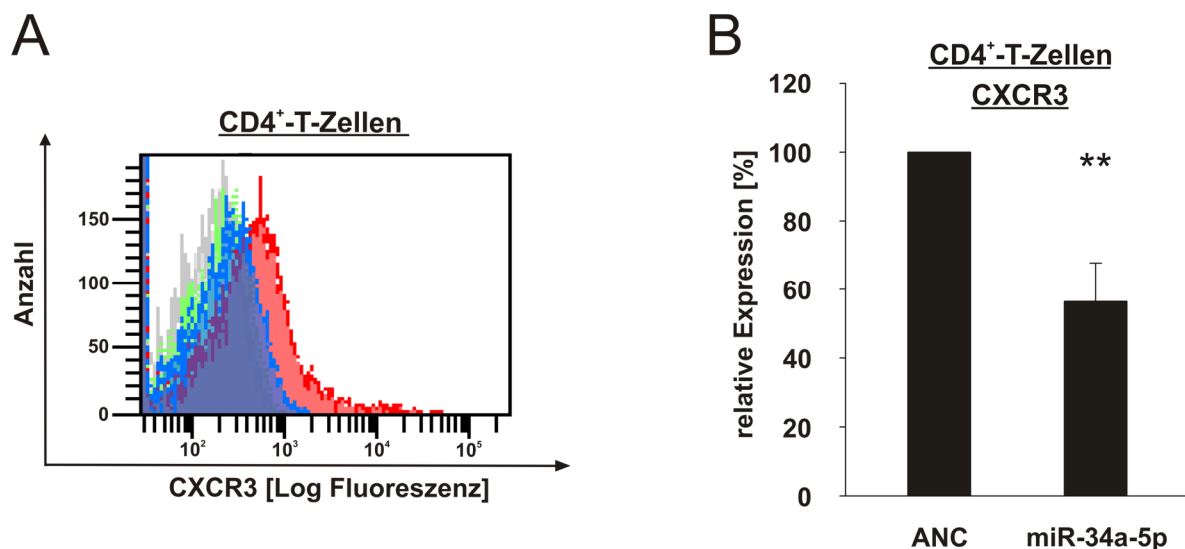


Abbildung 20: Ergebnisse der Durchflusszytometrie. CD4⁺-T-Zellen wurden aus Vollblut isoliert, mit ANC oder miR-34a-5p transfiziert und 24 h später mit PMA/Ionomycin aktiviert. CD4 und CXCR3 wurden mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Die intakten CD4⁺-Zellen wurden gated. (A) Exemplarische Darstellung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten der CXCR3⁺ CD4⁺-T-Zellen. Auf der X-Achse ist die Fluoreszenz angegeben, je höher dieser Wert ist, umso mehr CXCR3 ist auf der Oberfläche der CD4⁺-Zellen exprimiert. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der CD4⁺-Zellen angegeben. Im Schaubild sind die Resultate der Durchflusszytometrie der mit miR-34a-5p-Mimic transfizierten (blau) und mit ANC-transfizierten (rot) Zellen sowie die Ergebnisse der jeweiligen Isotypenkontrollen (grau und grün) dargestellt. (B): Es wurden insgesamt 4 FACS-Messungen im Doppelansatz mit CD4⁺-T-Zellen von zwei Spendern durchgeführt. Die Darstellung zeigt den relativen Anteil CXCR3⁺ CD4⁺-Zellen nach Transfektion mit miR-34a-5p-Mimic im Verhältnis zu der mit ANC transfizierten Kontrolle. **= p-Wert ≤ 0,01.

Für die Berechnung der Abhängigkeit der CXCR3-Menge von der miR-34a-5p-Expression wurde der Anteil der CXCR3⁺ CD4⁺-T-Zellen des Q2-Quadranten an der Gesamtpopulation herangezogen. Ungenauigkeiten aufgrund unselektiver CXCR3-Antikörperbindung wurden durch die Isotypkontrolle herausgerechnet (s. Anhang). Die statistische Auswertung erfolgte durch die Anwendung eines unabhängigen T-Tests. Nach Transfektion mit miR-34a-5p-Mimic zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der CXCR3-Oberflächenexpression auf 56,4 % gegenüber den mit ANC kontrolltransfizierten CD4⁺-T-Zellen ($p = 8,4 \times 10^{-3}$).

6.3.1.2 Western Blot

Zur Quantifizierung der Gesamtmenge an CXCR3 in CD4⁺-T-Zellen wurden Western Blots durchgeführt. Ein repräsentativer Western Blot sowie die Auswertung der drei unabhängig durchgeführten Western Blots in Form eines Balkendiagramms sind in Abbildung 21 dargestellt.

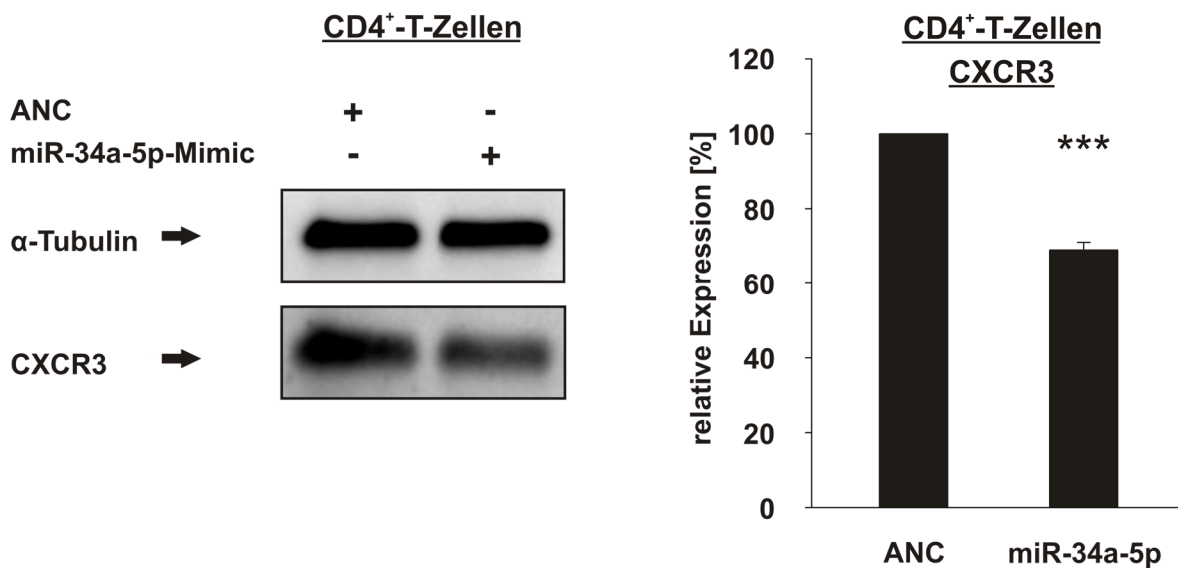


Abbildung 21: Exemplarische Darstellung und Ergebnisse der Western Blots. CD4⁺-Zellen wurden isoliert, mit ANC oder miR-34a-5p-Mimic transfiziert und 24 h nach der Transfektion für 24 h mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die stimulierten CD4⁺-T-Zellen wurden lysiert, die Proteine mittels Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen geblottet. Die endogene CXCR3-Proteinmenge der CD4⁺-T-Zellen wurde mit einem CXCR3-spezifischen Antikörper sowie einem Meerrettichperoxidase-markierten Sekundärantikörper gefärbt. Zur Normierung auf die aufgetragene Proteinmenge wurde das Haushaltsgen α-Tubulin ebenfalls detektiert und Meerrettichperoxidase-markiert. Die Quantifizierung über die Farbdichtemessung erfolgte mittels Image Lab Software. Auf der linken Bildhälfte ist als Beispiel einer der durchgeführten Western Blots dargestellt. Rechts sind die gemittelten Ergebnisse der insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Western Blots zu erkennen. *** = p-Wert ≤ 0,001.

Die in Triplikaten mit miR-34a-5p oder ANC transfizierten CD4⁺-T-Zellen wurden homogenisiert und die freigesetzten Proteine denaturiert und aufgereinigt. Die hierbei entstandenen Proteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran

geblottet. Die CXCR3-Bande wurde durch von Meerrettichperoxidase-markierten Sekundärantikörpern detektiert und mithilfe der zugehörigen Image Lab 6.0-Software quantifiziert. Im Anschluss wurde zur Normierung die Menge des Haushaltgens α -Tubulin analog zur vorher beschriebenen Vorgehensweise bestimmt. Die relative CXCR3-Proteinmenge der mit ANC transfizierten Zellen wurde als 100 % definiert und die CXCR3-Expression der mit miR-34a-5p-Mimic transfizierten CD4⁺-T-Zellen hierzu ins Verhältnis gesetzt. Es wurden drei unabhängige Western Blot-Experimente durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware SigmaPlot unter der Durchführung eines ungepaarten Student's T-Tests. Hierbei ergab sich bei den mit miR-34a-5p-Mimic transfizierten CD4⁺-Zellen im Vergleich zu der mit ANC transfizierten Kontrolle eine Reduktion der CXCR3-Proteinmenge auf 69 %. Diese Differenz erwies sich als statistisch hoch signifikant ($p = 4,3 \times 10^{-6}$).

6.3.2 Quantitative Analyse der CXCL10- und CXCL11-Expression von M1-Makrophagen bei miR-34a-5p-Überexpression

CXCL10 und CXCL11 werden unter anderem von M1-Makrophagen sezerniert (CHENG et al., 2019), die Erhöhung ihrer mRNA-Expression gehört zu den Markern der M1-Polarisierung (JAGUIN et al., 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine miR-34a-5p-Überexpression in Makrophagen eine Veränderung der endogenen CXCL10- und CXCL11-Expression zu Folge hat.

M1-Makrophagen wurden aus Monozyten, welche aus frischem Vollblut isoliert wurden, zu M1-Makrophagen differenziert. Die Monozyten wurden entsprechend des Kitprotokolls über Adhärenz positiv selektioniert und 9 Tage zu M1-Makrophagen ausdifferenziert. Am 10. Tag wurden die Zellen in Triplikaten mit miR-34a-5p-Mimic und ANC transfiziert und nach 48 h mit LPS und IFN- γ stimuliert. 4 h nach der Stimulierung konnten die Makrophagen geerntet werden. Hierbei wurde das Zellkulturmedium, in welches die Chemokine sezerniert wurden, für ELISAs eingesetzt. Aus den Makrophagen wurde die RNA isoliert und diese revers transkribiert. Mit der hierbei entstandenen cDNA wurden qPCRs zur Transfektionskontrolle durchgeführt (siehe 9.3).

Zur Quantifizierung der von M1-Makrophagen sezernierten Chemokine CXCL10 und CXCL11 wurden die M1-Zellkulturüberstände mittels ELISA untersucht. Hierbei wurden die Chemokine durch adhärente Antikörper an das Reaktionsgefäß gebunden. An die Chemokine lagerten sich Primärantikörper an, diese wurden durch Meerrettichperoxidase markiert. Die Meerrettichperoxidase löst eine Farbumschlagsreaktion aus. Die Intensität der Färbung konnte photometrisch bestimmt werden und verhielt sich proportional zu der Chemokinkonzentration. Durch den Vergleich mit Standards wurde die Menge an CXCL10 und CXCL11 berechnet. Eine Transfektion mit miR-34a-5p-Mimic reduzierte die CXCL10-Sekretion auf 69,3 % der

CXCL10-Menge, die im Zellüberstand der mit ANC transfizierten Kontrolle bestimmt werden konnte. Die Durchführung eines ungepaarten Student's T-Tests ergab eine hohe Signifikanz für die vorliegende Differenz ($p = 9,5 \times 10^{-6}$). Die CXCL11-Sekretion im Überstand der mit miR-34a-5p-Mimic transfizierten M1-Makrophagen verringerte sich ebenfalls hoch signifikant ($p = 3,0 \times 10^{-5}$) auf 59,2 % im Vergleich zur CXCL11-Menge in der Kontrolle. Abbildung 22 zeigt die Resultate der ELISAs in Form eines Balkendiagramms.

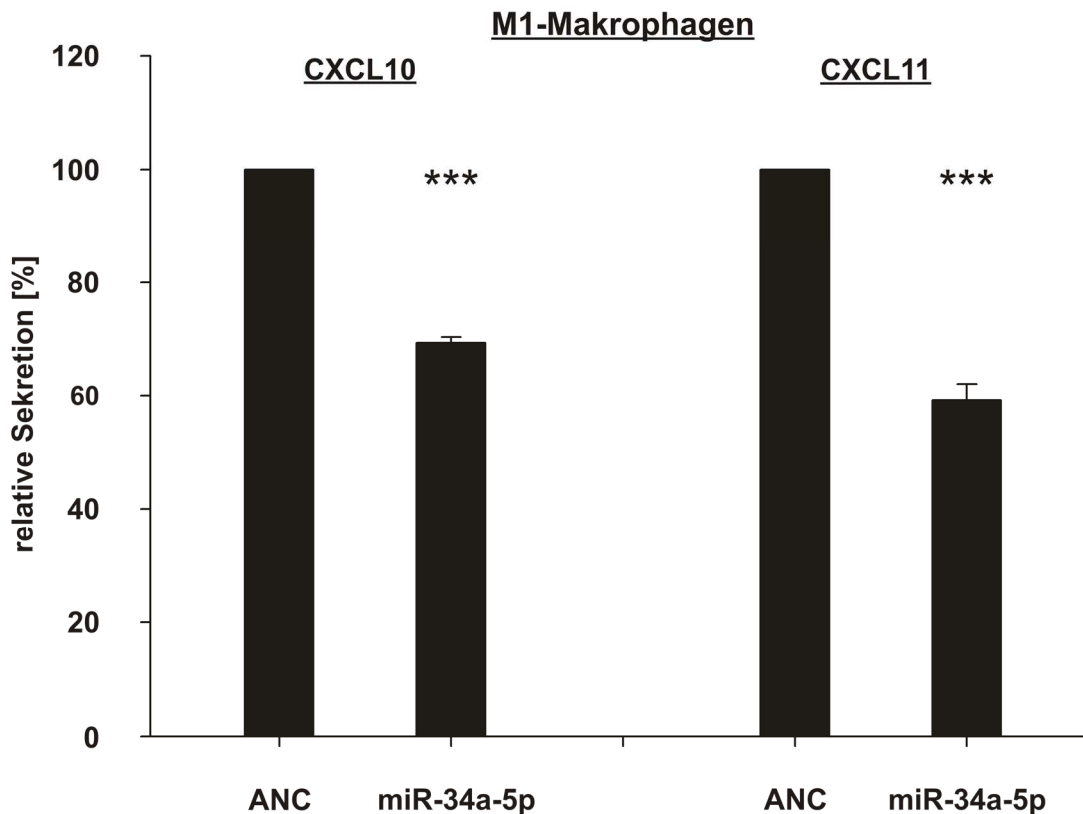


Abbildung 22: Ergebnisse der ELISAs. In drei unabhängigen Versuchen mit jeweils zwei Spendern wurden Monozyten aus Vollblut isoliert und zu M1-Makrophagen differenziert. Diese wurden mit miR-34a-5p und ANC transfiziert und nach 48 h mit LPS/IFN- γ aktiviert. Nach 4-stündiger Aktivierung wurden die Überstände in ELISAs zur Quantifizierung von CXCL10 und CXCL11 eingesetzt. Die Sterne symbolisieren die mit $p \leq 0,001$ hoch signifikante Reduktion von CXCL10 und CXCL11 im Überstand der mit miR-34a-5p transfizierten M1-Makrophagen im Vergleich zu der mit ANC transfizierten Kontrolle. ***= p-Wert $\leq 0,001$.

7 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der miR-34a-5p in M1-Makrophagen besser zu verstehen. Mit Hilfe eines Microarrays, in dem Genexpression der mit miR-34a-5p transfizierten M1-Makrophagen untersucht wurde, und anschließenden Zielgenvorhersagen wurden multiple Gene aus der CXC-Chemokinfamilie als mögliche direkte Zielgene der miR-34a-5p identifiziert. Mit Hilfe von Dual-Luciferase-Assays konnte die miRNA-Zielgen-Interaktion für den CXC-Chemokin-rezeptor *CXCR3* sowie die Chemokinliganden *CXCL1*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL14* und *CXCL16* bestätigt werden. Darüber hinaus wurde der reprimierende Einfluss der miR-34a-5p auf die *CXCR3*-Proteinexpression in CD4⁺-T-Zellen mittels Western Blot und Durchfluss-zytometrie validiert. In ELISAs zeigte sich, dass die miR-34a-5p-Überexpression die *CXCL10*- und *CXCL11*-Sekretion in M1-Makrophagen reguliert und somit Einfluss auf die *CXCL10/CXCL11/CXCR3*-Achse hat.

Die *CXCL10/CXCL11/CXCR3*-Achse ist an zentralen Funktionen des Immunsystems, wie der T_H1-vermittelten Immunantwort, beteiligt und nimmt eine komplexe Rolle in der Immunantwort bei Tumorerkrankungen ein (TOKUNAGA et al., 2018). Da bei Krebserkrankungen die miR-34a-5p sowohl in Tumorzellen als auch in Immunzellsubsets dereguliert ist (FUJITA et al., 2008; GALLARDO et al., 2009; HART et al., 2016; LEIDINGER et al., 2014; TAZAWA et al., 2007), könnten die Ergebnisse dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis über die Rolle der miR-34a-5p bei der Antitumorantwort beitragen. Durch die Erkenntnisse über die Funktion der miR-34a-5p in M1-Makrophagen und CD4⁺-T-Zellen bietet sich darüber hinaus ein Erklärungsansatz für schwerwiegende, immunbedingte Nebenwirkungen in der Phase-I-Studie des miR-34a-5p-Therapeutikums MRX34 (HONG et al., 2020).

7.1 Genexpressionsanalyse von miR-34a-5p überexprimierenden M1-Makrophagen mittels Microarray

Zunächst wurde mittels Microarray der Einfluss der miR-34a-5p auf Genexpression in M1-Makrophagen untersucht, da diese vermehrt in Tumorgewebe zu finden sind (JACKUTE et al., 2018) und eine verstärkte Stromainfiltration, insbesondere durch M1-Makrophagen, ein bedeutsamer prädiktiver Faktor für das Überleben von Krebspatienten ist (OHRI et al., 2009; WELSH et al., 2005; ZHENG et al., 2020). Zudem ist in den Vorläuferzellen der Makrophagen, den Monozyten, von Bronchialkarzinompatienten die miR-34a-5p-Expression erhöht (HART et al., 2016; LEIDINGER et al., 2014), sodass diese möglicherweise einen Einfluss auf die Tumorentstehung und -progression haben könnte.

Es gibt einige Studien, in denen die Veränderungen der mRNA-Expression bei miR-34a-5p-Überexpression in Tumorzellen untersucht wurden. In den zugehörigen Veröffentlichungen

wurden vor allem mRNAs mit Relevanz für Zellzyklus, Wachstum und Metastasierung als reduziert identifiziert (LAL et al., 2011; ZHANG et al., 2015). Hingegen zeigten in der hier vorliegenden Arbeit vor allem mRNAs, die mit immunologischen Prozessen verknüpft sind, eine reduzierte Expression. Dies könnte in den unterschiedlichen Funktionen und den sich daher unterscheidenden mRNA-Expressionsmustern der untersuchten Zellen begründet sein. Es gibt jedoch auch ohne eine direkte Vergleichsmöglichkeit Hinweise, die die Validität der hier gezeigten Ergebnisse untermauern: Eine Protein-Netzwerk-Analyse der 20 am stärksten reprimierten mRNAs zeigte multiple Interaktionen zwischen 7 der mRNAs, während unter den hochregulierten mRNAs nur eine Interaktion identifiziert wurde. Neben den mRNAs der in dieser Arbeit untersuchten Chemokine *CXCL10* und *CXCL11* wurden auch die mRNAs von *IL6* und *IFNB1* in der Microarrayanalyse als stark reduziert identifiziert. Beide Proteine sind eng mit der Funktion von M1-Makrophagen verbunden (CHEN et al., 2019; JANEWAY, 1992; MANTOVANI et al., 2007). Darüber hinaus konnten sowohl *IL6* als auch *IFNB1* bereits als Zielgene der miR-34a-5p identifiziert werden, wodurch die Ergebnisse des Microarrays bestätigt werden konnten (ROKAVEC et al., 2014; ZHANG et al., 2021). Die am zweitstärksten erniedrigte mRNA *RBFox2* (*RBM9*) ist mit miR-34a-5p assoziiert, jedoch ist RBFox2 als Repressor der miR-34a-5p beschrieben (HU et al., 2019). Daher deutet die Repression von *RBM9* bei miR-34a-5p-Überexpression in M1-Makrophagen auf einen Regelkreis (*feedback loop*) hin. Dieser Effekt der miR-34a-5p auf bereits bestätigte Zielgene wie *IL-6*, *IFN β 1* sowie auf *CXCL10* und *CXCL11*, die im Rahmen dieser Arbeit als Zielgene der miR-34a-5p identifiziert werden konnten, weist auf eine Hemmung der Funktionalität von M1-Makrophagen durch die miR-34a-5p hin.

7.2 Zielgenidentifizierung der miR-34a-5p durch Dual-Luciferase-Assays

Im nächsten Schritt erfolgte die Testung potenzieller Zielgene der miR-34a-5p. Hierfür wurden Dual-Luciferase-Assays eingesetzt. Diese dienen der direkten Zielgenidentifikation, da durch die Assays die tatsächliche Interaktion der miR-34a-5p mit der vorhergesagten Bindestelle in der 3'UTR geprüft wird. Durch Kombination der Ergebnisse der Microarray-Genexpressionsanalyse von miR-34a-5p überexprimierenden M1-Makrophagen mit Signalwegsanalysen und Zielgenvorhersagen wurden 8 Liganden und 3 Rezeptoren der CXC-Familie zur Testung in Dual-Luciferase-Assays ausgewählt.

Die Gene *CXCR3*, *CXCL1*, *CXCL10*, *CXCL14* und *CXCL16* wurden als direkte Zielgene der miR-34a-5p bestätigt, was einer Validierungsrate von 54,5 % entspricht. Diese Rate steht im Einklang mit Resultaten anderer Arbeiten zur Untersuchung der Funktion der miR-34a-5p in Immunzellen, deren zu testende Zielgene nach ähnlichen Kriterien ausgewählt wurden (DIENER et al., 2018; HART et al., 2019b). Daher erscheint diese Validierungsrate realistisch.

Interessanterweise konnte CXCL1 als Zielgen bestätigt werden, wohingegen CXCL2, dessen 3'UTR-Sequenz inklusive einer identischen miR-34a-5p Bindestelle zu 87 % mit der CXCL1-3'UTR identisch ist, keine signifikante Reduktion im Dual-Luciferase-Assays aufwies. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine abweichende Sekundärstruktur der CXCL2-3'UTR sein. Eine Literaturrecherche zeigte, dass CXCL10 und CXCL11 Liganden von CXCR3 sind (COLE et al., 1998) und diese CXCL10/CXCL11/CXCR3-Achse eine wichtige Rolle bei der Lungenkrebsentstehung spielt (ARENBERG et al., 1996; WU et al., 2019). Daher lag der Fokus der weiteren Experimenten auf der Rolle der miR-34a-5p bei der Regulation der CXCL10/CXCL11/CXCR3-Achse.

7.3 Quantitative Analyse der CXCR3-Expression von CD4⁺-T-Zellen bei miR-34a-5p-Überexpression

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Dual-Luciferase-Assays konnte CXCR3 als Zielgen der miR-34a-5p bestätigt werden. Dieses Ergebnis wurde durch Durchflusszytometriemessungen und Western Blots für CD4⁺-T-Zellen validiert, indem eine Transfektion mit miR-34a-5p-Mimic eine Reduktion der CXCR3-Proteinmenge sowie eine verringerte CXCR3-Expression auf der Oberfläche der CD4⁺-T-Zellen zu Folge hatte. CXCR3 wird von aktivierten CD4⁺-T-Zellen, aktivierten CD8⁺-T-Zellen, natürlichen Killer- (NK) und natürlichen Killer-T-Zellen (NKT), plasmazytoiden dendritischen Zellen und Endothelzellen exprimiert (BAILEY et al., 2014; CELLA et al., 1999; LASAGNI et al., 2003; LOETSCHER et al., 1996; QIN et al., 1998; REDJIMI et al., 2012). CXCR3 liegt in drei Isoformen vor – CXCR3a, CXCR3b, sowie CXCR3alt – die durch alternatives Spleißen gebildet werden (EHLERT et al., 2004; LASAGNI et al., 2003; LOETSCHER et al., 1996). Da die mRNAs dieser drei Isoformen über eine identische 3'UTR verfügen, reguliert die miR-34a-5p mutmaßlich alle drei Varianten gleichermaßen.

7.4 Quantitative Analyse der CXCL10- und CXCL11-Expression von M1-Makrophagen bei miR-34a-5p-Überexpression

CXCL10 und CXCL11 werden unter anderem von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Tumorzellen sezerniert (COLE et al., 1998; HUMAN PROTEIN ATLAS, 2006, 2017; LUSTER, RAVETCH, 1987; MACH et al., 1999; MUTHUSWAMY et al., 2008; OHMORI et al., 1993; TOKUNAGA et al., 2018; UHLÉN et al., 2015). Die CXCL10- und CXCL11-Sekretion wird durch IFN- γ angeregt (COLE et al., 1998; LUSTER, RAVETCH, 1987; QIAN et al., 2007; RANI et al., 1996). IFN- β ist ein wichtiger Stimulator für CXCL11 und in geringerem Maß auch für CXCL10 (COLE et al., 1998; RANI et al., 1996). Weitere Stimulatoren sind IFN- α und

Tumornekrosefaktor(TNF)- α (QI et al., 2009; RANI et al., 1996). Auch die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs trägt zur Induktion der Expression von CXCL10 und CXCL11 bei (GAO et al., 2019; SCHMID et al., 2006). Da die miR-34a-5p multiple Zielgene des NF- κ B-Signalwegs reguliert (HART et al., 2019a; ZANIN-ZHOROV et al., 2011), könnte die Expression von CXCL10/-11, zusätzlich zur direkten postranskriptionellen Kontrolle durch die miR-34a-5p, über die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs in M1-Makrophagen die Reduktion der CXCL10/-11-Expression verstärken.

Eine weitere Bestätigung der Ergebnisse dieser Arbeit lieferten Xu et al., die erstmals einen Zusammenhang zwischen der miR-34a-5p-Expression und CXCL10 nachweisen konnten: In Brustkrebszelllinien wirkte sich die miR-34a-5p über eine Reduktion von CXCL10 hemmend auf Wachstum, Tumorzellmigration und Invasion in andere Gewebe aus (XU et al., 2018). CXCL11 bindet zudem an CXCR7. Dieser Chemokinrezeptor wird unter anderem im Bronchialkarzinom exprimiert (BURNS et al., 2006) und ist mit einer Förderung der Angiogenese assoziiert (MAISHI et al., 2012; WÜRTH et al., 2011; ZHENG et al., 2010). Im Maus/Mensch-Xenograft führt die Hemmung von CXCR7 zu einem deutlich verringerten Tumorwachstum (BURNS et al., 2006). Eine miR-34a-5p-induzierte CXCL11-Reduktion senkt die CXCR7-Aktivierung und wirkt auf diesem Weg potenziell tumorsuppressiv.

Im Gegensatz hierzu steht die Inhibition von CCR3 durch CXCL10 und CXCL11 (LOETSCHER et al., 2001). Dieser Chemokinrezeptor ist im Bronchialkarzinom mit einer verstärkten Angiogenese und Tumorwachstum assoziiert (HUANG et al., 2016). Die Reduktion der CXCL10- und CXCL11-Menge durch die miR-34a-5p kann daher zu einer verringerten Hemmung von CCL3 beitragen und zu einer verstärkten Angiogenese und Tumorwachstum führen.

CXCL10 und CXCL11 sind beide Liganden von CXCR3, binden jedoch an unterschiedliche Bindestellen (COLVIN et al., 2004). CXCL11 besitzt die höchste Affinität zu CXCR3 aller CXCR3-Liganden (COLE et al., 1998; GROOM et al., 2012). Somit könnte die Überexpression von miR-34a-5p über die Reduktion der CXCL10 und CXCL11-Mengen zu einer geringeren CXCR3-Aktivierung führen, wodurch CXCR3-abhängige Signale abgeschwächt werden könnten. Auf die Effekte einer CXCL10- oder CXCL11-abhängigen CXCR3-Rezeptoraktivierung wird im Abschnitt 7.5.2 näher eingegangen.

7.5 Regulation der CXCL10/CXCL11/CXCR3-Achse durch die miR-34a-5p

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass nicht nur die Chemokinliganden CXCL10 und CXCL11, sondern auch ihr Chemokinrezeptor CXCR3 durch miR-34a-5p reguliert werden. Dementsprechend wird die Funktionalität der gesamten CXCL10/CXCL11/CXCR3-Achse durch die miR-34a-5p massiv beeinträchtigt.

7.5.1 Regulation der Chemotaxis durch die miR-34a-5p-abhängige CXCL10/CXCL11/CXCR3-Achse

CXCL10 und CXCL11 bewirken die Chemotaxis von CXCR3⁺-Zellen entlang des entstehenden Chemokingradienten. Die Chemotaxis wird durch einen CXCR3a-vermittelten Kalziumeinstrom ausgelöst (JI et al., 2008; LASAGNI et al., 2003; WU et al., 2012). Die miR-34a-5p beeinflusst als ein zentraler Modulator den Kalziumeinstrom (SOCE) sowie das intrazelluläre Kalzium-Signaling (DIENER et al., 2018). Somit könnte die miR-34a-5p durch Reduktion des CXCR3-Levels zusätzlich einen Einfluss auf Kalziumsignalwege nehmen, welche ihrerseits die Chemotaxis von Immunzellen steuern.

Zu den CXCR3⁺-Zellen gehören CD4⁺-T_H1-Zellen, natürliche Killer-Zellen, natürliche Killer-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen, sowie regulatorische T-Zellen (T_{regs}) (QIN et al., 1998). Im Folgenden wird auf die Bedeutung einer miR-34a-5p-Überexpression für die Chemotaxis der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen eingegangen. Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass die miR-34a-5p-Überexpression in CD4⁺-T-Zellen zu einer Reduktion der CXCR3-Expression führt und in M1-Makrophagen eine verringerte CXCL10- und CXCL11-Sekretion zur Folge hat. Da CXCL10 und CXCL11 chemotaktisch auf CD4⁺-T-Zellen wirken (MOHAN et al., 2002; TAUB et al., 1993) könnte eine Reduktion von CXCL10 und CXCL11 zu einer verminderten Chemotaxis von CD4⁺-T-Zellen führen. Da zudem der CXCR3-Rezeptor der CD4⁺-T-Zellen verringert exprimiert wird, ist eine massive Beeinträchtigung der Chemotaxis von CD4⁺-T-Zellen durch die miR-34a-5p zu erwarten. Eine Metaanalyse von Geng et al. zeigt, dass eine Infiltration von CD4⁺-T-Zellen in das Stroma sowie in das Tumornest von Bronchialkarzinomen mit einer signifikant besseren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert ist (GENG et al., 2015). Somit könnte eine miR-34a-5p-Überexpression in Immunzellen das Überleben von Bronchialkarzinompatienten negativ beeinflussen.

Die posttranskriptionelle Repression von CXCR3 durch die miR-34a-5p konnte für CD8⁺-T-Zellen, zu denen die CTLs gehören, ebenfalls experimentell validiert werden (HART et al., 2020). Eine erhöhte CXCL11-Sekretion in Bronchialkarzinomen bewirkt eine gesteigerte Chemotaxis CD8⁺-T-Zellen in den Tumor (GAO et al., 2019). In einem orthotopen Mensch/Maus-Bronchialkarzinom-Xenograft ging eine Blockade von CXCL9 und CXCL10 mit einer verringerten Ansammlung von CXCR3⁺ CD8⁺-T-Zellen im Tumor einher (ANDERSSON et al., 2011), während die Überexpression von CXCL10 im Tumor die Chemotaxis von CXCR3⁺ CD8⁺-T-Zellen positiv beeinflusst (YUE et al., 2015). Somit könnte eine Reduktion der CXCL10- und CXCL11-Sekretion der im Tumormilieu befindlichen M1-Makrophagen und eine verringerte CXCR3-Expression auf CD8⁺-T-Zellen durch die Überexpression der miR-34a-5p einen negativen Einfluss auf die Chemotaxis haben. Eine verstärkte Infiltration des Tumors durch CD8⁺-T-Zellen korrelierte mit einem längeren Überleben der Patienten (GAO et

al., 2019), während eine verringerte CD8⁺-T-Zell-Zahl und zu einem verstärkten Tumorstromwachstum führte (ANDERSSON et al., 2011). Daher könnte eine Verminderung der Chemotaxis durch miR-34a-5p-Überexpression in CD8⁺-T-Zellen den Progress einer Karzinomkrankung fördern. Der mögliche Einfluss der miR-34a-5p-Überexpression auf die Chemotaxis von CXCR3⁺ T-Zellen ist in Abbildung 23 dargestellt.

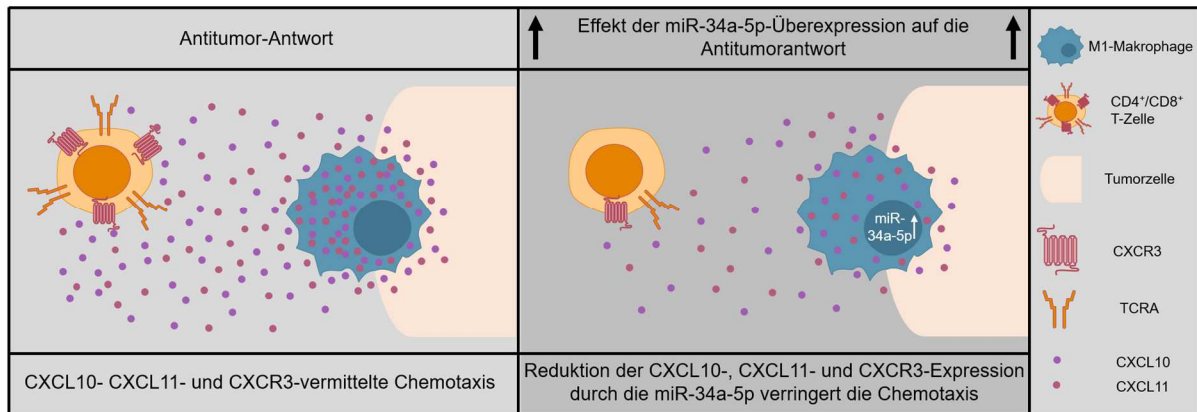


Abbildung 23: Effekt der miR-34a-5p auf die Chemotaxis der T-Zellen. Eine miR-34a-5p-Überexpression bewirkt in T-Zellen eine posttranskriptionelle Repression von CXCR3 sowie der α -Kette des T-Zell-Rezeptors (TCRA, *T-cell receptor alpha locus*) (HART et al., 2018; HART et al., 2019a) und führt in Makrophagen zu einer reduzierten CXCL10- und CXCL11-Sekretion. Die CXCL10/CXCL11/CXCR3-Achse ermöglicht die Migration von CXCR3⁺-Zellen in den Tumor, jedoch verringert die miR-34a-5p diese Signaltransduktion sowohl auf Liganden- als auch auf Rezeptorebene und beeinflusst somit die Chemotaxis.

7.5.2 Regulation der CD4⁺ Zell-Differenzierung durch die miR-34a-5p-abhängige CXCL10/CXCL11/CXCR3-Achse

Neben dem Einfluss auf die Chemotaxis von CXCR3⁺ Zellen zum Tumor könnte eine erhöhte miR-34a-5p-Expression Auswirkungen auf die Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen in deren Subpopulationen haben. Durch die Bindung von CXCL10 und CXCL11 an CXCR3 werden unterschiedliche Signalübertragungswege aktiviert (ZOHAR et al., 2014). Zohar et al. konnten zeigen, dass CXCL11 eine Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen in regulatorische T-Zellen vom Typ 1 (Tr1-Zellen) induziert (ZOHAR et al., 2014). Tr1-Zellen wirken hemmend auf die Immunantwort (GREGORI et al., 2012). Eine miR-34a-5p-induzierte Reduktion der CXCL11-Expression führt somit zu einer verringerten Aktivität regulatorischer T-Zellen. Die Interaktion von CXCL10 mit CXCR3 scheint im Gegensatz hierzu die Differenzierung in T_H1-Effektorzellen zu fördern: Gangur et al. wiesen für aktivierte humane PBMCs durch Inkubation mit CXCL10 eine verstärkte T_H1-Zellaktivität nach (GANGUR et al., 1998). Die Ergebnisse dieser Publikation legen nahe, dass die miR-34a-5p eine verringerte Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen zu T_H1-Zellen zur Folge haben könnte. Die miR-34a-5p könnte sowohl über CXCL10 als auch über CXCR3 die Differenzierung von T_H1-Zellen beeinflussen, woraus wiederum eine geringere IFN- γ - und IL-2-Expression resultieren würde (ROMAGNANI, 1999). T_H1-Zellen

aktivieren über IL-2 und IFN- γ die ebenfalls CXCR3⁺ CTLs, zu denen auch die CD8⁺-T-Zellen gehören (PULIAEV et al., 2004; TOKUNAGA et al., 2018) sowie die CXCL10 und CXCL11 sezernierenden M1-Makrophagen (MURPHY, 2018). Somit könnte es durch miR-34a-5p-Überexpression zu einem erhöhten T_{H2}/T_{H1}-Verhältnis kommen, welches mit einem erhöhten Rezidivrisiko bei operierten Bronchialkarzinompatienten assoziiert ist (ITO et al., 1999).

7.5.3 Die miR34a-5p, die CXCL10/CXCL11/CXCR3 Achse und Krebs

Die miR-34a-5p ist als Tumorsuppressor-miRNA bekannt (SIEMENS et al., 2013; YAMAMURA et al., 2012). Die Bedeutung der durch die miR-34a-5p reprimierten CXCL10/11/CXCR3-Achse in der Immunantwort gegen Krebs ist jedoch komplexer, wie Tokunaga et al. zusammenfassen (TOKUNAGA et al., 2018). Wie in den obigen Abschnitten beschrieben, fördert die Achse parakrin die T_{H1}-vermittelte Immunantwort und die Differenzierung, Aktivierung und Chemotaxis von CD4⁺ T_{H1}-Zellen und CD8⁺ CTLs, die eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen Krebs spielen (GAO et al., 2019; GENG et al., 2015; ITO et al., 1999; YANG et al., 2006). Auch ist die Sekretion von CXCL10 und CXCL11 eine zentrale Funktion von M1-Makrophagen, deren Infiltration ins Tumorstroma mit dem Überleben korreliert (ZHENG et al., 2020). Mitsächlich für die Antitumorwirkung könnte diese Chemokinsekretion sein, da Untersuchungen im Mausmodell darauf hindeuten, dass Injektionen von CXCL10 in den Tumor dessen Wachstum verringern können (ARENBERG et al., 2001). Im Gegensatz hierzu fördert die CXCL10/11/CXCR3-Achse autokrin Wachstum, Angiogenese sowie Metastasierung von Tumoren (TOKUNAGA et al., 2018). CXCR3⁺ Krebszellen neigen zu einer verstärkten Metastasierung in chemokinreiche Regionen wie Lymphknoten (KAWADA et al., 2007). Für eine erfolgreiche Antitumorantwort müsste die CXCR3-Expression auf den Tumorzellen daher inhibiert und die parakrine Achse, und damit die T_{H1}-vermittelte Immunität sowie die Migration von CTL, NKs und NKTs in den Tumor, gefördert werden (TOKUNAGA et al., 2018).

Therapeutisch wurde diese These bereits im Mausmodell untermauert, da hier die Blockade von CXCR3 in Tumorzellen mit AMG487 die Metastasierungsrate senkt (CAMBIEN et al., 2009; ZHU et al., 2015). Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die Ergebnisse weiterer Studien für die Hypothese, dass sich eine erniedrigte miR-34a-5p-Expression in den Tumorzellen und eine erhöhte miR-34a-5p-Expression in den Immunzellen prognostisch ungünstig auf Tumorerkrankungen auswirken würde.

7.6 Die miR-34a-5p in der Tumorthherapie

Aufgrund ihrer Funktion als Tumorsuppressor-miRNA wurde bereits versucht, ein liposomales Mimic der miR-34a-5p, MRX34, in der Tumorthherapie einzusetzen, um die miR-34a-5p-Expression in den Tumorzellen zu erhöhen. Die Phase-I-Studie (NCT01829971) musste jedoch aufgrund des Auftretens schwerer immunvermittelter Nebenwirkungen, die in vier Fällen zum Tod der Patienten führten, abgebrochen werden (HONG et al., 2020). Da MRX34 intravenös verabreicht wurde, ist diese nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von im Blut zirkulierenden Immunzellen MRX34 aufgenommen worden, sodass die mRNA-Expression von miR-34a-5p-Zielgenen in Leukozyten herunterreguliert wurde (HONG et al., 2020). Die Ergebnisse dieser Arbeit in Kombination mit Ergebnissen vorheriger Studien zeigen, dass die miR-34a-5p zentrale Funktionen von CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und M1-Makrophagen, wie das Kalzium-Signaling, das NF- κ B-Signaling, die α -Kette des T-Zell-Rezeptors (TCRA) und die CXCL10/CXCL11/CXCR3-Achse reguliert (DIENER et al., 2018; HART et al., 2018; HART et al., 2020; HART et al., 2019a). Dies könnte verschiedenste immunologische Nebenwirkungen zur Folge haben. Bei den mit MRX34 behandelten Patienten zeigte sich laborchemisch eine Lymphozytopenie, die durch diese miR-34a-5p-vermittelten Mechanismen, z. B. durch den Einfluss auf die T_H1-vermittelte Immunantwort, verstärkt werden könnte. Neben den Veränderungen des Blutbilds traten Entzündungsgeschehen, darunter schwere Colitiden, eine Pneumonitis und ein Fall eines Zytokin-Freisetzungssyndroms, die eine autoimmune Überreaktion des Immunsystems vermuten lassen, auf (HONG et al., 2020). Die fehlende Induktion von Tr1 durch die miR-34a-5p induzierte Reduktion von CXCL11 könnte hierbei eine Rolle spielen (KARIN et al., 2016; ZOHAR et al., 2014).

Um Off-Target-Effekte, wie insbesondere immunologische Nebenwirkungen, so gering wie möglich zu halten, wäre eine zu untersuchende Möglichkeit, die Darreichungsform des MRX34 zu ändern, um die miR-34a-5p möglichst selektiv im Tumor zu erhöhen und so eine miR-34a-5p-Überexpression in Immunzellen zu verhindern. Eine potenzielle Methode zum Erreichen einer selektiven miR-34a-5p-Überexpression in den Tumorzellen ist die Verwendung von speziellen Nanocarriern, stable nucleic acid lipid vesicles (SNALPs), mit denen die miR-34a-5p bereits erfolgreich in Zellen des Multiplen Myeloms eingebracht wurde. Hierbei sorgte eine Konjugation mit Transferrin für eine präferierte Aufnahme der miR-34a-5p in die Zellen des Multiplen Myeloms, da diese den Transferrin-Rezeptor überexprimieren (SCOGNAMIGLIO et al., 2014). Es ist jedoch weitere Forschung nötig, um die Ursache dieser immunologischen Fehlreaktionen bei MRX34-Gabe vollständig zu verstehen, sodass anhand dessen die Darreichungsformen der synthetischen miR-34a-5p angepasst werden können.

8 Literaturverzeichnis

1. Aaij C, Borst P (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* 269:192-200
2. Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B, Schuster B, Kallen KJ, Saftig P, Rose-John S, Ludwig A (2004) The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol* 172:6362-6372
3. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, Buechi L, Walz A, Richmond A, Strieter RM (2000) The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* 165:5269-5277
4. Agilent Technologies (o. D.). pSG5 Vector Instruction Manual, Catalog #216201 Revision A
5. Alharris E, Alghetaa H, Seth R, Chatterjee S, Singh NP, Nagarkatti M, Nagarkatti P (2018) Resveratrol Attenuates Allergic Asthma and Associated Inflammation in the Lungs Through Regulation of miRNA-34a That Targets FoxP3 in Mice. *Front Immunol* 9:2992
6. 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*
7. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, Margalit H (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* 33:2697-2706
8. Andersson A, Srivastava MK, Harris-White M, Huang M, Zhu L, Elashoff D, Strieter RM, Dubinett SM, Sharma S (2011) Role of CXCR3 ligands in IL-7/IL-7R alpha-Fc-mediated antitumor activity in lung cancer. *Clin Cancer Res* 17:3660-3672
9. Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, Morris SB, Burdick MD, Glass MC, Taub DT, Iannettoni MD, Whyte RI, Strieter RM (1996) Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med* 184:981-992
10. Arenberg DA, White ES, Burdick MD, Strom SR, Strieter RM (2001) Improved survival in tumor-bearing SCID mice treated with interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL10). *Cancer Immunol Immunother* 50:533-538
11. Arnemann J (2019). DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Gressner A.M. AT, ed. (Springer Reference Medizin, Springer, Berlin, Heidelberg).
12. Atarod S, Norden J, Bibby LA, Janin A, Ratajczak P, Lendrem C, Pearce KF, Wang XN, O'Reilly S, Van Laar JM, Collin M, Dickinson AM, Crossland RE (2018) Differential MicroRNA Expression Levels in Cutaneous Acute Graft-Versus-Host Disease. *Front Immunol* 9:1485
13. Avery OT, Macleod CM, McCarty M (1944) STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *J Exp Med* 79:137-158

14. Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, Paulos CM (2014) Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Front Immunol* 5:276
15. Bank A, Terada M, Metafora S, Dow L, Marks PA (1972) In vitro synthesis of DNA components of human genes for globins. *Nat New Biol* 235:167-169
16. Barbato C, Arisi I, Frizzo ME, Brandi R, Da Sacco L, Masotti A (2009) Computational challenges in miRNA target predictions: to be or not to be a true target? *J Biomed Biotechnol* 2009:803069
17. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215-233
18. Bartel DP (2018) Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173:20-51
19. BD Biosciences (2011). BD FACSCanto II Flow Cytometer. Technical Specifications
20. BD Biosciences (2021a). FITC Mouse Anti-Human CD4
21. BD Biosciences (2021b). APC Mouse Anti-Human CD183
22. Becker S, Quay J, Koren HS, Haskill JS (1994) Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am J Physiol* 266:L278-286
23. 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
24. 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
25. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD (2014) Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 14:359-370
26. 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
27. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDougald OA, Cho KR, Fearon ER (2007) p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol* 17:1298-1307
28. Bonocchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F (1998) Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187:129-134
29. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13:1097-1101
30. Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, degli Uberti EC (2005) miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 204:280-285
31. Boyles JS, Beidler CB, Strifler BA, Girard DS, Druzina Z, Durbin JD, Swearingen ML, Lee LN, Kikly K, Chintharlapalli S, Witcher DR (2020) Discovery and characterization of a neutralizing pan-ELR+CXC chemokine monoclonal antibody. *MAbs* 12:1831880
32. Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203

33. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203:2201-2213
34. Cabrero-de Las Heras S, Martínez-Balibrea E (2018) CXC family of chemokines as prognostic or predictive biomarkers and possible drug targets in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 24:4738-4749
35. 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
36. Cambien B, Karimjee BF, Richard-Fiardo P, Bziouech H, Barthel R, Millet MA, Martini V, Birnbaum D, Scoazec JY, Abello J, Al Saati T, Johnson MG, Sullivan TJ, Medina JC, Collins TL, Schmid-Alliana A, Schmid-Antomarchi H (2009) Organ-specific inhibition of metastatic colon carcinoma by CXCR3 antagonism. *Br J Cancer* 100:1755-1764
37. Candeias SM, Gaipi US (2016) The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 16:101-107
38. Carney DA, Wierda WG (2005) Genetics and molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 6:215-225
39. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5:919-923
40. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65:6029-6033
41. Chen CY, Zheng D, Xia Z, Shyu AB (2009) Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat Struct Mol Biol* 16:1160-1166
42. Chen X, Fu E, Lou H, Mao X, Yan B, Tong F, Sun J, Wei L (2019) IL-6 induced M1 type macrophage polarization increases radiosensitivity in HPV positive head and neck cancer. *Cancer Lett* 456:69-79
43. Cheng H, Wang Z, Fu L, Xu T (2019) Macrophage Polarization in the Development and Progression of Ovarian Cancers: An Overview. *Front Oncol* 9:421
44. Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, Johnston WK, Russ C, Luo S, Babiarz JE, Belloch R, Schroth GP, Nusbaum C, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev* 24:992-1009
45. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
46. Choreño-Parra JA, Thirunavukkarasu S, Zúñiga J, Khader SA (2020) The protective and pathogenic roles of CXCL17 in human health and disease: Potential in respiratory medicine. *Cytokine Growth Factor Rev* 53:53-62
47. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (1997). Overview of Reverse Transcription. In *Retroviruses*, Coffin JM, SH Hughes, HE Varmus, eds. (Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press.).
48. 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

49. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K (1998) Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 187:2009-2021
50. Collins PJ, McCully ML, Martinez-Munoz L, Santiago C, Wheeldon J, Caucheteux S, Thelen S, Cecchinato V, Laufer JM, Purvanov V, Monneau YR, Lortat-Jacob H, Legler DF, Ugucioni M, Thelen M, Piguet V, Mellado M, Moser B (2017) Epithelial chemokine CXCL14 synergizes with CXCL12 via allosteric modulation of CXCR4. *Faseb j* 31:3084-3097
51. Colvin RA, Campanella GS, Sun J, Luster AD (2004) Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. *J Biol Chem* 279:30219-30227
52. Corcoran DL, Pandit KV, Gordon B, Bhattacharjee A, Kaminski N, Benos PV (2009) Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One* 4:e5279
53. Crawford LV, Pim DC, Gurney EG, Goodfellow P, Taylor-Papadimitriou J (1981) Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:41-45
54. Davis-Dusenbery BN, Hata A (2010) Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem* 148:381-392
55. Desbaillets I, Diserens AC, Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG (1997) Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J Exp Med* 186:1201-1212
56. 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
57. Dittrich W, Gohde W (1969) [Impulse fluorometry of single cells in suspension]. *Z Naturforsch B* 24:360-361
58. Dubnau D (1999) DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 53:217-244
59. Ehler JE, Addison CA, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM (2004) Identification and partial characterization of a variant of human CXCR3 generated by posttranscriptional exon skipping. *J Immunol* 173:6234-6240
60. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498
61. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T (2001b) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo j* 20:6877-6888
62. Elkin K, Riviello J, Small H (2015) Improvements in ion reflux: An electroalytic eluent generation and suppression device for ion chromatography. *J Chromatogr A* 1403:63-69
63. Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874
64. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79:351-379
65. Fernandez EJ, Lolis E (2002) Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:469-499

66. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811
67. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251:767-773
68. Frank F, Sonenberg N, Nagar B (2010) Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 465:818-822
69. Frey AB, Monu N (2008) Signaling defects in anti-tumor T cells. *Immunol Rev* 222:192-205
70. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92-105
71. Fromm B, Billipp T, Peck LE, Johansen M, Tarver JE, King BL, Newcomb JM, Sempere LF, Flatmark K, Hovig E, Peterson KJ (2015) A Uniform System for the Annotation of Vertebrate microRNA Genes and the Evolution of the Human microRNAome. *Annu Rev Genet* 49:213-242
72. Fujita Y, Kojima K, Hamada N, Ohhashi R, Akao Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M (2008) Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377:114-119
73. Gallardo E, Navarro A, Vinolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramirez J, Monzo M (2009) miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* 30:1903-1909
74. Gangur V, Simons FE, Hayglass KT (1998) Human IP-10 selectively promotes dominance of polyclonally activated and environmental antigen-driven IFN-gamma over IL-4 responses. *Faseb j* 12:705-713
75. Gao Q, Wang S, Chen X, Cheng S, Zhang Z, Li F, Huang L, Yang Y, Zhou B, Yue D, Wang D, Cao L, Maimela NR, Zhang B, Yu J, Wang L, Zhang Y (2019) Cancer-cell-secreted CXCL11 promoted CD8(+) T cells infiltration through docetaxel-induced-release of HMGB1 in NSCLC. *J Immunother Cancer* 7:42
76. Geng Y, Shao Y, He W, Hu W, Xu Y, Chen J, Wu C, Jiang J (2015) Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Cancer: a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem* 37:1560-1571
77. 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
78. 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
79. Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG (2012) The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Front Immunol* 3:30
80. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R (2006) MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol* 342:33-47
81. Griffith F (1966) The significance of pneumococcal types. *J Hyg (Lond)* 64:129-124
82. Griffiths-Jones lab (2018). miRBase: the microRNA database
83. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106:23-34

84. Groom JR, Richmond J, Murooka TT, Sorensen EW, Sung JH, Bankert K, von Andrian UH, Moon JJ, Mempel TR, Luster AD (2012) CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation. *Immunity* 37:1091-1103
85. Gross N, Kropp J, Khatib H (2017) MicroRNA Signaling in Embryo Development. *Biology (Basel)* 6
86. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466:835-840
87. Ha M, Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:509-524
88. Haasnoot J, Westerhout EM, Berkhout B (2007) RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol* 25:1435-1443
89. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293:1146-1150
90. Hara T, Tanegashima K (2014) CXCL14 antagonizes the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *Biomol Concepts* 5:167-173
91. Hart M, Rheinheimer S, Leidinger P, Backes C, Menegatti J, Fehlmann T, Grasser F, Keller A, Meese E (2016) Identification of miR-34a-target interactions by a combined network based and experimental approach. *Oncotarget* 7:34288-34299
92. Hart M, Kern F, Backes C, Rheinheimer S, Fehlmann T, Keller A, Meese E (2018) The deterministic role of 5-mers in microRNA-gene targeting. *RNA Biol* 15:819-825
93. Hart M, Walch-Ruckheim B, Friedmann KS, Rheinheimer S, Tanzer T, Glombitza B, Sester M, Lenhof HP, Hoth M, Schwarz EC, Keller A, Meese E (2019a) miR-34a: a new player in the regulation of T cell function by modulation of NF-kappaB signaling. *Cell Death Dis* 10:46
94. Hart M, Walch-Rückheim B, Krammes L, Kehl T, Rheinheimer S, Tänzer T, Glombitza B, Sester M, Lenhof HP, Keller A, Meese E (2019b) miR-34a as hub of T cell regulation networks. *J Immunother Cancer* 7:187
95. 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
96. Haskill S, Peace A, Morris J, Sporn SA, Anisowicz A, Lee SW, Smith T, Martin G, Ralph P, Sager R (1990) Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7732-7736
97. Heinrich PC, Müller, Matthias, Graeve, Lutz (2014) Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*, Vol 9., vollständig überarbeitete Auflage (Berlin, Springer).
98. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio/Technology* 11:1026-1030
99. Hofmann MA, Brian DA (1991) Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony. *Biotechniques* 11:30-31
100. 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

101. Hromas R, Broxmeyer HE, Kim C, Nakshatri H, Christopherson K, 2nd, Azam M, Hou YH (1999) Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 255:703-706
102. Hu J, Gao C, Wei C, Xue Y, Shao C, Hao Y, Gou LT, Zhou Y, Zhang J, Ren S, Chen J, Wang Y, Fu XD (2019) RBFox2-miR-34a-Jph2 axis contributes to cardiac decompensation during heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:6172-6180
103. Huang G, Tao L, Shen S, Chen L (2016) Hypoxia induced CCL28 promotes angiogenesis in lung adenocarcinoma by targeting CCR3 on endothelial cells. *Sci Rep* 6:27152
104. Hughes CE, Nibbs RJB (2018) A guide to chemokines and their receptors. *Febs j* 285:2944-2971
105. Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA (1969) Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 166:747-749
106. Human Protein Atlas (2006). The Human Protein Atlas
107. Human Protein Atlas (2017). CXCL11 (V20.1 Human Protein Atlas)
108. Hutchison CA, 3rd, Phillips S, Edgell MH, Gillam S, Jahnke P, Smith M (1978) Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J Biol Chem* 253:6551-6560
109. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293:834-838
110. Hydbring P, Wang Y, Fassel A, Li X, Matia V, Otto T, Choi YJ, Sweeney KE, Suski JM, Yin H, Bogorad RL, Goel S, Yuzugullu H, Kauffman KJ, Yang J, Jin C, Li Y, Floris D, Swanson R, Ng K, Sicinska E, Anders L, Zhao JJ, Polyak K, Anderson DG, Li C, Sicinski P (2017) Cell-Cycle-Targeting MicroRNAs as Therapeutic Tools against Refractory Cancers. *Cancer Cell* 31:576-590.e578
111. Iida N, Grotendorst GR (1990) Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. *Mol Cell Biol* 10:5596-5599
112. Inouye M (2016) The first demonstration of RNA interference to inhibit mRNA function. *Gene* 592:332-333
113. Ito N, Nakamura H, Tanaka Y, Ohgi S (1999) Lung carcinoma: analysis of T helper type 1 and 2 cells and T cytotoxic type 1 and 2 cells by intracellular cytokine detection with flow cytometry. *Cancer* 85:2359-2367
114. Ivey KN, Srivastava D (2010) MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell* 7:36-41
115. Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y (2010) Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* 39:292-299
116. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskienė B, Miliauskas S, Vaitkienė S, Sakalauskas R (2018) Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC Immunol* 19:3
117. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V (2013) Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol* 281:51-61

118. Janeway CA, Jr. (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 13:11-16
119. Ji R, Lee CM, Gonzales LW, Yang Y, Aksoy MO, Wang P, Brailoiu E, Dun N, Hurford MT, Kelsen SG (2008) Human type II pneumocyte chemotactic responses to CXCR3 activation are mediated by splice variant A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L1187-1196
120. Josephy PD, Eling T, Mason RP (1982) The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *J Biol Chem* 257:3669-3675
121. Kacian DL, Spiegelman S, Bank A, Terada M, Metafora S, Dow L, Marks PA (1972) In vitro Synthesis of DNA Components of Human Genes for Globins. *Nature New Biology* 235:167
122. Karin N, Wildbaum G, Thelen M (2016) Biased signaling pathways via CXCR3 control the development and function of CD4+ T cell subsets. *J Leukoc Biol* 99:857-862
123. Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, Sakashita H, Manabe T, Shimahara Y, Sakai Y, Takabayashi A, Oshima M, Taketo MM (2007) Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene* 26:4679-4688
124. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115:209-216
125. Kobayashi H, Tomari Y (2016) RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta* 1859:71-81
126. Koenen M, R  ther U, M  ller-Hill B (1982) Immunoenzymatic detection of expressed gene fragments cloned in the lac Z gene of *E. coli*. *Embo j* 1:509-512
127. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42:D68-73
128. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 47:D155-d162
129. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-858
130. Lal A, Thomas MP, Altschuler G, Navarro F, O'Day E, Li XL, Concepcion C, Han YC, Thiery J, Rajani DK, Deutsch A, Hofmann O, Ventura A, Hide W, Lieberman J (2011) Capture of microRNA-bound mRNAs identifies the tumor suppressor miR-34a as a regulator of growth factor signaling. *PLoS Genet* 7:e1002363
131. Landthaler M, Gaidatzis D, Rothbauer A, Chen PY, Soll SJ, Dinic L, Ojo T, Hafner M, Zavolan M, Tuschl T (2008) Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *Rna* 14:2580-2596
132. Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, Lazzeri E, Giannini S, Cosmi L, Sagrinati C, Mazzinghi B, Orlando C, Maggi E, Marra F, Romagnani S, Serio M, Romagnani P (2003) An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med* 197:1537-1549
133. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858-862
134. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854

135. Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:862-864
136. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo j* 21:4663-4670
137. 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
138. 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
139. Lehman IR (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* 186:790-797
140. Leidinger P, Backes C, Dahmke IN, Galata V, Huwer H, Stehle I, Bals R, Keller A, Meese E (2014) What makes a blood cell based miRNA expression pattern disease specific?--a miRNome analysis of blood cell subsets in lung cancer patients and healthy controls. *Oncotarget* 5:9484-9497
141. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115:787-798
142. Li L, Yuan L, Luo J, Gao J, Guo J, Xie X (2013) MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1. *Clin Exp Med* 13:109-117
143. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C (2007) Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 8:166
144. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305:1437-1441
145. Lo HM, Shieh JM, Chen CL, Tsou CJ, Wu WB (2013) Vascular endothelial growth factor induces CXCL1 chemokine release via JNK and PI-3K-dependent pathways in human lung carcinoma epithelial cells. *Int J Mol Sci* 14:10090-10106
146. Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Korner H, Knyazev P, Diebold J, Hermeking H (2008) Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 7:2591-2600
147. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B (1996) Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 184:963-969
148. Loetscher P, Pellegrino A, Gong JH, Mattioli I, Loetscher M, Bardi G, Baggiolini M, Clark-Lewis I (2001) The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J Biol Chem* 276:2986-2991
149. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303:95-98
150. Luster AD, Ravetch JV (1987) Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* 166:1084-1097
151. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD (1999) Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 104:1041-1050
152. Maerki C, Meuter S, Liebi M, Muhlemann K, Frederick MJ, Yawalkar N, Moser B, Wolf M (2009) Potent and broad-spectrum antimicrobial activity of CXCL14 suggests an immediate role in skin infections. *J Immunol* 182:507-514
153. Maishi N, Ohga N, Hida Y, Akiyama K, Kitayama K, Osawa T, Onodera Y, Shinohara N, Nonomura K, Shindoh M, Hida K (2012) CXCR7: a novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. *Pathol Int* 62:309-317

154. Mandel M, Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53:159-162
155. Maniataki E, Mourelatos Z (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 19:2979-2990
156. Mantovani A, Sica A, Locati M (2007) New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 37:14-16
157. Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG (2000) A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* 1:298-304
158. Matzke MA, Primig M, Trnovsky J, Matzke AJ (1989) Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *Embo j* 8:643-649
159. Miller MC, Mayo KH (2017) Chemokines from a Structural Perspective. *Int J Mol Sci* 18
160. Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, Farooqi AA, Lombardi A, Campani V, Zarone MR, Gulla A, Tagliaferri P, Tassone P, Caraglia M (2014) Mir-34: a new weapon against cancer? *Mol Ther Nucleic Acids* 3:e194
161. Mizuno T, Chou MY, Inouye M (1984) A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1966-1970
162. Mohan K, Ding Z, Hanly J, Issekutz TB (2002) IFN-gamma-inducible T cell alpha chemoattractant is a potent stimulator of normal human blood T lymphocyte transendothelial migration: differential regulation by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 168:6420-6428
163. Mueller A, Meiser A, McDonagh EM, Fox JM, Petit SJ, Xanthou G, Williams TJ, Pease JE (2008) CXCL4-induced migration of activated T lymphocytes is mediated by the chemokine receptor CXCR3. *J Leukoc Biol* 83:875-882
164. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273
165. Murphy K (2018) *Janeway Immunologie*, 9. Aufl. 2018 edn (Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg).
166. Murphy PM (1994) The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 12:593-633
167. Muthuswamy R, Urban J, Lee JJ, Reinhart TA, Bartlett D, Kalinski P (2008) Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. *Cancer Res* 68:5972-5978
168. Nakajima C, Mukai T, Yamaguchi N, Morimoto Y, Park WR, Iwasaki M, Gao P, Ono S, Fujiwara H, Hamaoka T (2002) Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN-gamma stimulation. *Eur J Immunol* 32:1792-1801
169. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289
170. Nathans D, Smith HO (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu Rev Biochem* 44:273-293
171. Navarro F, Lieberman J (2015) miR-34 and p53: New Insights into a Complex Functional Relationship. *PLoS One* 10:e0132767
172. Nguyen TA, Jo MH, Choi YG, Park J, Kwon SC, Hohng S, Kim VN, Woo JS (2015) Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* 161:1374-1387

173. Noble PB, Cutts JH (1967) Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *Can Vet J* 8:110-111
174. Novina CD, Sharp PA (2004) The RNAi revolution. *Nature* 430:161-164
175. Ohmori Y, Wyner L, Narumi S, Armstrong D, Stoler M, Hamilton TA (1993) Tumor necrosis factor-alpha induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. *Am J Pathol* 142:861-870
176. Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA (1997) Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 272:14899-14907
177. Ohri CM, Shikotra A, Green RH, Waller DA, Bradding P (2009) Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur Respir J* 33:118-126
178. Onuffer JJ, Horuk R (2002) Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments. *Trends Pharmacol Sci* 23:459-467
179. Otte M, Kliever A, Schütz D, Reimann C, Schulz S, Stumm R (2014) CXCL14 is no direct modulator of CXCR4. *FEBS Lett* 588:4769-4775
180. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4:2411-2423
181. Panaro NJ, Yuen PK, Sakazume T, Fortina P, Kricka LJ, Wilding P (2000) Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the agilent 2100 bioanalyzer. *Clin Chem* 46:1851-1853
182. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86-89
183. Peng Y, Croce CM (2016) The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther* 1:15004
184. Promega (2021). pGEM®-T Easy Vector Systems
185. Promega (o.D). Efficient T-Vector Cloning with Blue/White Selection
186. PromoCell (2020). Differentiation of M1- or M2-Macrophages From PBMC/Monocytes
187. Puliaev R, Nguyen P, Finkelman FD, Via CS (2004) Differential requirement for IFN-gamma in CTL maturation in acute murine graft-versus-host disease. *J Immunol* 173:910-919
188. Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Jin D, Huang XZ, Li JH, Deung YK, Lee KJ (2009) Essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TNF-alpha in CXCL10 production in human THP-1 monocytes. *J Cell Physiol* 220:690-697
189. QIAGEN (2013a). HiPerFect Transfection Reagent
190. QIAGEN (2013b). PolyFect Transfection Reagent
191. QIAGEN (2013c). AllStars Negative Control siRNA
192. QIAGEN (2013d). miScript miRNA Mimics
193. Qian C, An H, Yu Y, Liu S, Cao X (2007) TLR agonists induce regulatory dendritic cells to recruit Th1 cells via preferential IP-10 secretion and inhibit Th1 proliferation. *Blood* 109:3308-3315
194. Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR (1998) The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101:746-754

195. Rani MR, Foster GR, Leung S, Leaman D, Stark GR, Ransohoff RM (1996) Characterization of beta-R1, a gene that is selectively induced by interferon beta (IFN-beta) compared with IFN-alpha. *J Biol Chem* 271:22878-22884
196. Redjimi N, Raffin C, Raimbaud I, Pignon P, Matsuzaki J, Odunsi K, Valmori D, Ayyoub M (2012) CXCR3+ T regulatory cells selectively accumulate in human ovarian carcinomas to limit type I immunity. *Cancer Res* 72:4351-4360
197. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901-906
198. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14:1902-1910
199. Rokavec M, Öner MG, Li H, Jackstadt R, Jiang L, Lodygin D, Kaller M, Horst D, Ziegler PK, Schwitalla S, Slotta-Huspenina J, Bader FG, Greten FR, Hermeking H (2014) IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J Clin Invest* 124:1853-1867
200. Romagnani S (1999) Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 5:285-294
201. Rossi DL, Hurst SD, Xu Y, Wang W, Menon S, Coffman RL, Zlotnik A (1999) Lungkine, a novel CXC chemokine, specifically expressed by lung bronchoepithelial cells. *J Immunol* 162:5490-5497
202. Rothe G (2007). Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, Sack U TA, Rothe G, ed. (Basel, Karger), pp. 27-70.
203. Sambrook J (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
204. Sathe GM, O'Brien S, McLaughlin MM, Watson F, Livi GP (1991) Use of polymerase chain reaction for rapid detection of gene insertions in whole yeast cells. *Nucleic Acids Res* 19:4775
205. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M (2007) MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 100:416-424
206. Schipper HM, Maes OC, Chertkow HM, Wang E (2007) MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells. *Gene Regul Syst Bio* 1:263-274
207. Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y, Henger A, Brunner B, Eichinger F, Nitsche A, Kiss E, Bleich M, Gröne HJ, Nelson PJ, Schlöndorff D, Cohen CD, Kretzler M (2006) Modular activation of nuclear factor-kappaB transcriptional programs in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 55:2993-3003
208. Scognamiglio I, Di Martino MT, Campani V, Virgilio A, Galeone A, Gullà A, Gallo Cantafio ME, Misso G, Tagliaferri P, Tassone P, Caraglia M, De Rosa G (2014) Transferrin-conjugated SNALPs encapsulating 2'-O-methylated miR-34a for the treatment of multiple myeloma. *Biomed Res Int* 2014:217365
209. Sgaramella V, Van de Sande JH, Khorana HG (1970) Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67:1468-1475
210. Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV, Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28:815-820
211. Shein HM, Enders JF (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48:1164-1172

212. Shein HM, Enders JF, Levinthal JD (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. II. Cell-virus relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48:1350-1357
213. Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita T, Ohsumi J, Yoshie O, Yonehara S (2004) Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J Leukoc Biol* 75:267-274
214. Siemens H, Jackstadt R, Kaller M, Hermeking H (2013) Repression of c-Kit by p53 is mediated by miR-34 and is associated with reduced chemoresistance, migration and stemness. *Oncotarget* 4:1399-1415
215. Smith BJ (1984) SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol* 1:41-55
216. Striegel AM (2015) HISTORY OF CHROMATOGRAPHY Hamish Small: Experimenter Extraordinaire. *LC GC Eur* 33:776-781
217. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, et al. (1995) The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 270:27348-27357
218. Tang X, Wen S, Zheng D, Tucker L, Cao L, Pantazatos D, Moss SF, Ramratnam B (2013) Acetylation of drosha on the N-terminus inhibits its degradation by ubiquitination. *PLoS One* 8:e72503
219. Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ (1993) Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 177:1809-1814
220. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H (2007) Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15472-15477
221. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, McSkane M, Baba H, Lenz HJ (2018) CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 63:40-47
222. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354
223. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347:1260419
224. Van Weemen BK, Schuurs AH (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* 15:232-236
225. Vischer E, Chargaff E (1948) The separation and quantitative estimation of purines and pyrimidines in minute amounts. *J Biol Chem* 176:703-714
226. von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, Schmidt S, Bork P, Snel B (2003) STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res* 31:258-261
227. Wang W, Kwon EJ, Tsai LH (2012) MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. *Learn Mem* 19:359-368

228. Weber MJ (2005) New human and mouse microRNA genes found by homology search. *Febs j* 272:59-73
229. Welch C, Chen Y, Stallings RL (2007) MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 26:5017-5022
230. Welsh TJ, Green RH, Richardson D, Waller DA, O'Byrne KJ, Bradding P (2005) Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23:8959-8967
231. Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, Andrew DP, Wu L, Briskin M (2001) Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J Immunol* 166:5145-5154
232. Wu Q, Dhir R, Wells A (2012) Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion. *Mol Cancer* 11:3
233. Wu XZ, Zhai K, Yi FS, Wang Z, Wang W, Wang Y, Pei XB, Shi XY, Xu LL, Shi HZ (2019) IL-10 promotes malignant pleural effusion in mice by regulating T(H) 1- and T(H) 17-cell differentiation and migration. *Eur J Immunol* 49:653-665
234. Würth R, Barbieri F, Bajetto A, Pattarozzi A, Gatti M, Porcile C, Zona G, Ravetti JL, Spaziante R, Florio T (2011) Expression of CXCR7 chemokine receptor in human meningioma cells and in intratumoral microvasculature. *J Neuroimmunol* 234:115-123
235. Xu M, Li D, Yang C, Ji JS (2018) MicroRNA-34a Inhibition of the TLR Signaling Pathway Via CXCL10 Suppresses Breast Cancer Cell Invasion and Migration. *Cell Physiol Biochem* 46:1286-1304
236. Yamamura S, Saini S, Majid S, Hirata H, Ueno K, Deng G, Dahiya R (2012) MicroRNA-34a modulates c-Myc transcriptional complexes to suppress malignancy in human prostate cancer cells. *PLoS One* 7:e29722
237. Yang X, Chu Y, Wang Y, Zhang R, Xiong S (2006) Targeted in vivo expression of IFN-gamma-inducible protein 10 induces specific antitumor activity. *J Leukoc Biol* 80:1434-1444
238. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17:3011-3016
239. Yue C, Shen S, Deng J, Priceman SJ, Li W, Huang A, Yu H (2015) STAT3 in CD8+ T Cells Inhibits Their Tumor Accumulation by Downregulating CXCR3/CXCL10 Axis. *Cancer Immunol Res* 3:864-870
240. Zanin-Zhorov A, Dustin ML, Blazar BR (2011) PKC- θ function at the immunological synapse: prospects for therapeutic targeting. *Trends Immunol* 32:358-363
241. Zhang J, Wang Y, Chen X, Zhou Y, Jiang F, Chen J, Wang L, Zhang WF (2015) MiR-34a suppresses amphiregulin and tumor metastatic potential of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Oncotarget* 6:7454-7469
242. Zhang X, Chapat C, Wang P, Choi JH, Li Q, Luo J, Wiebe S, Kim SH, Robichaud N, Karam IF, Dai D, Hackett AP, Lin R, Alain T, Yang L, Jafarnejad SM, Sonenberg N (2021) microRNA-induced translational control of antiviral immunity by the cap-binding protein 4EHP. *Mol Cell* 81:1187-1199.e1185
243. Zheng K, Li HY, Su XL, Wang XY, Tian T, Li F, Ren GS (2010) Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 29:31
244. Zheng X, Weigert A, Reu S, Guenther S, Mansouri S, Bassaly B, Gattenlöhner S, Grimminger F, Pullamsetti S, Seeger W, Winter H, Savai R (2020) Spatial

- Density and Distribution of Tumor-Associated Macrophages Predict Survival in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Res* 80:4414-4425
245. Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, Zhang ZG, Freedman JH, Zheng Y, Cai L (2018) miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 39:1073-1084
246. Zhu G, Yan HH, Pang Y, Jian J, Achyut BR, Liang X, Weiss JM, Wiltrout RH, Hollander MC, Yang L (2015) CXCR3 as a molecular target in breast cancer metastasis: inhibition of tumor cell migration and promotion of host anti-tumor immunity. *Oncotarget* 6:43408-43419
247. Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127
248. Zohar Y, Wildbaum G, Novak R, Salzman AL, Thelen M, Alon R, Barsheshet Y, Karp CL, Karin N (2014) CXCL11-dependent induction of FOXP3-negative regulatory T cells suppresses autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 124:2009-2022

9 Anhang

9.1 CXCL16-Mutante

Da sich in der 3'UTR von CXCL16 mehrere potenzielle Bindestellen der miR-34a-5p befinden, wurde ein Oligonukleotid von Eurofins synthetisiert, in welchem die fraglichen Bindestellen mutiert vorlagen. Abbildung 24 zeigt die die Nukleotidsequenz des synthetisierten Oligonukleotids.

```

GTGCAGTGGCATGATCTCGGCTCACTGCAACCCCATCTCCCAGGTTCAAGCGATTCT
CAATATTCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGTGCTCACCACCACACCCGGCTAATTT
TTTGTATTTTAGTAGAGACGGGTCACCATGTTGACCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGA
CCTGGTGATGTATACACCCAGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTAAGGTGTGAGCCAC
CATGCCTGGCCCTATGTGTGTTTTTAACTACTAAAAATTATTTTGTAAATGATTGAGTC
TTCTTATGGAAACAACCTGGCCTCAGCCCTTGCGCCCTTACTGTGATTCTGGCTTCATT
TTTTGCTGATGGTTCCCCCTCGTCCCAAATCTCTCTCCAGTACACCAGTTGTTCCGA
GCTC

```

Abbildung 24: Das CXCL16 mut Oligonukleotid in 5'→3' Richtung. Die grün gefärbten Nukleotide stellen die mutierten miR-34a-5p Bindestellen dar. Die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *Sac* I ist lila und die *Bsg* I-Erkennungsstelle blau markiert.

9.2 Durchflusszytometrie: Gating und Isotypenkontrolle

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse des Gatings sowie der Isotypenkontrolle dargestellt.

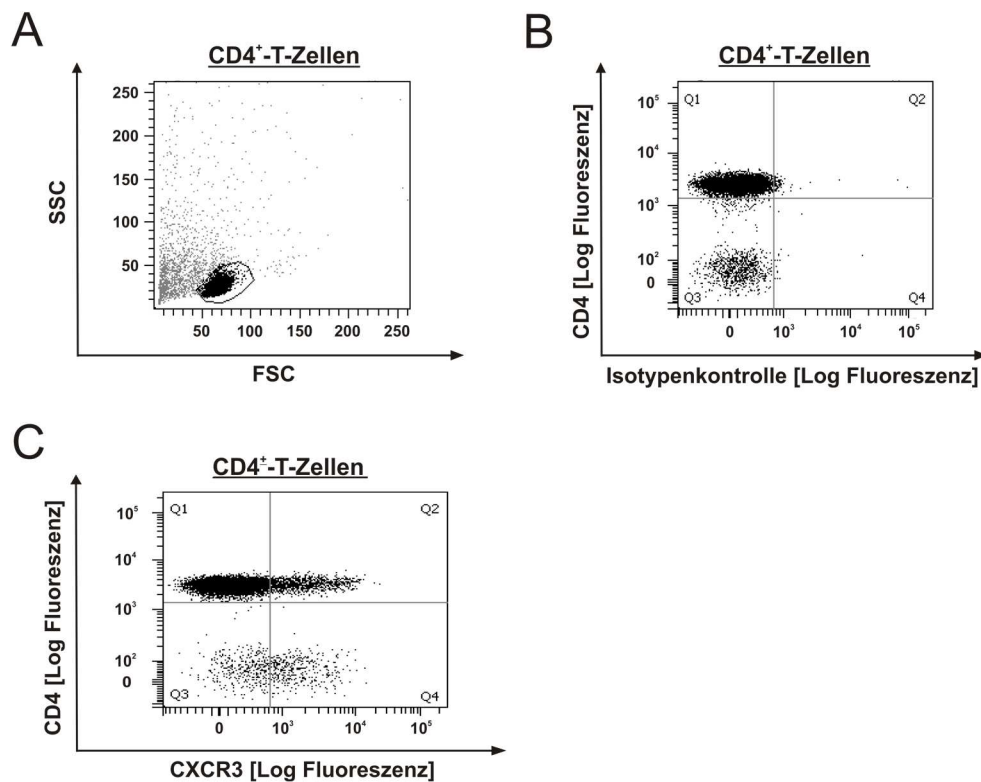


Abbildung 25: (A) Gating. CD4⁺-T-Zellen wurden aus Vollblut isoliert und mit ANC oder miR-34a-5p transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Aktivierung mit PMA/Ionomycin. CD4 und CXCR3 wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gekennzeichnet. Die intakten CD4⁺-Zellen wurden gated. **(B, C) Isotypenkontrolle.** Um die Spezifität des verwendeten CXCR3-Antikörpers zu testen, wurden naive CD4⁺-T-Zellen mit CD4-Antikörper sowie APC-gekoppeltem CXCR3-Antikörper oder einem unspezifisch bindenden, ebenfalls APC-gekoppeltem Isotypantikörper gefärbt. Der relative Q2-Anteil des Isotyps sollte bei 100 %-iger Spezifität des Antikörpers bei 0 % liegen. Für die Isotypkontrolle wurde der Anteil der durch die Isotypkontrolle positiven CD4-Zellen (Q2 in (B)) von dem durch den CXCR3-Antikörper detektierten Anteil (Q2 in (C)) subtrahiert.

9.3 Transfektionskontrolle mittels qPCR

Die qPCR diente der Quantifizierung des miR-34a-5p-Niveaus in den jeweiligen Zellen. Zu Beginn wurde die M1-Makrophagen-RNA isoliert. Diese wurde, um als Vorlage in der qPCR dienen zu können, im Verhältnis 1:1 in cDNA umgeschrieben. Während der qPCR erfolgte eine Vervielfältigung der Vorlagen-DNA, die durch Markierung der nach jedem PCR-Zyklus vorliegenden Doppelstränge durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green quantifiziert werden konnte. Je früher im PCR-Verlauf ein definierter Fluoreszenzschwellenwert (C_t) überschritten wurde, desto mehr cDNA war in der Probe vorhanden. Die Anzahl der Zyklen bis zur Überschreitung des Schwellenwerts (C_q) ist abhängig von der initial vorliegenden RNA-Menge. Aus der Differenz der ΔC_q -Werte ($\Delta\Delta C_q$) zweier Proben kann der *fold change* berechnet werden. Nach Normierung ergab die Subtraktion des C_q -Werts der mit ANC kontrolltransfizierten Zellen

von dem C_q -Wert der der mit miR-34a-5p-Mimic transfizierten M1-Makrophagen ein $\Delta\Delta C_q$ von -8,47 bzw. -7,49 für die jeweiligen Spender. Dies entspricht einem *fold change* von 354,7 bzw. 179,5, womit eine massive Überexpression der miR-34a-5p bestätigt wurde. In Abbildung 24 sind die errechneten *fold changes* der beiden Spender dargestellt. Aus der Änderung zwischen den beiden Proben konnte mit einem ungepaarten Student's T-Test die Signifikanz berechnet werden. Der p-Wert für die Differenz der C_q -Werte der mit miR-34a-5p-Mimic transfizierten M1-Makrophagen gegenüber den mit ANC transfizierten Kontrollen betrug für Spender 1 $p=2,4 \times 10^{-2}$ und für Spender 2 $p=1,2 \times 10^{-3}$. In Abbildung 26 sind die Resultate der Transfektionskontrolle graphisch dargestellt.

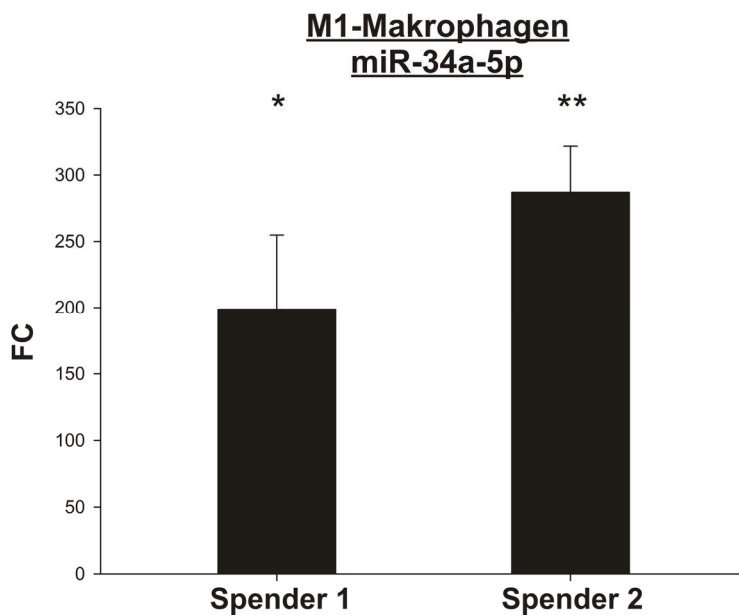


Abbildung 26: Transfektionskontrolle mittels qPCR. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde die miR-34a-5p-Menge in den M1-Makrophagen zweier Spender, deren Überstände in Triplikaten analysiert wurden, mittels qPCR quantifiziert. Hierfür wurde die RNA in cDNA revers transkribiert und im Anschluss eine qPCR durchgeführt. Nach Normierungen wurde aus der Differenz der cq -Werte der Δcq -Wert bestimmt, mit dem der *fold change* berechnet werden konnte. Signifikanzniveaus: * (schwach signifikant) $p \leq 0,05$, ** (signifikant) $p \leq 0,01$

10 Publikation

Nickl L*, Hart M*, 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. Journal for Immunotherapy of Cancer, IF: 13.751

*gleichberechtigte Erstautoren

11 Dank

Während der Erstellung dieser Arbeit – von der Durchführung des ersten Versuchs bis zum letzten geschriebenen Satz – konnte ich mich fachlich, aber auch persönlich weiterentwickeln. Für die Begleitung auf diesem Weg bedanke ich mich herzlich bei folgenden Personen:

Meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Eckart Meese danke ich vielmals für das entgegengebrachte Vertrauen sowie für die Möglichkeit, dieses spannende Thema zu bearbeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herr Dr. Martin Hart für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und seine außerordentliche Unterstützung. Den zahllosen Gesprächen mit ihm verdanke ich wertvolle Anregungen für die Arbeit. Nicht zuletzt hat auch sein menschlicher Beistand zum Erreichen dieses Ziels beigetragen.

Großer Dank gilt auch Frau Dr. Barbara Walch-Rückheim und Frau Tanja Tänzer aus der Virologie für die gute Zusammenarbeit, ihre Gesprächsbereitschaft und das Einbringen ihrer Expertise im Umgang mit primären Zellen.

Den Mitarbeiterinnen der AG Meese, Frau Lena Krammes, Frau Caroline Diener und Frau Stefanie Rheinheimer, danke ich ausdrücklich, da sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und sie mich mit ihrer Heiterkeit und Zuversicht begleiteten.

Bei den Mitarbeitern der Humangenetik bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und ihre Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Frau Laura Gröger für den fachlichen und persönlichen Austausch.

Frau Prof. Dr. Martina Sester danke ich für die Überlassung der Durchflusszytomeanlage.

Nicht zuletzt danke ich meinem Partner, meiner Familie und meinen Freunden für viele ausgleichende Momente während der Erstellung dieser Arbeit, für ermutigende Worte bei Rückschlägen und für ihren festen Glauben an mich.

12 Lebenslauf

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