

Aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. med. Gabriela Riemekasten

**Untersuchung der Wirkung von MicroRNAs auf die Expression der Proteinase 3
mittels eines dualen Luziferase-Reporterassays**

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Nick Reichard

aus Frankfurt am Main

Lübeck 2021

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Lamprecht

2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Henrik Oster

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.02.2022

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1 ANCA-assoziierte Vaskulitiden	1
1.1.1 Granulomatose mit Polyangiitis	2
1.1.2 Proteinase 3	4
1.2 MicroRNAs	5
1.2.1 Nomenklatur der miRNAs.....	6
1.2.2 Prozessierung von humanen miRNAs.....	6
1.2.3 Bindung von miRNAs an Ziel-mRNAs	7
1.2.4 MiRNAs bei rheumatischen und chronisch entzündlichen Erkrankungen.....	9
1.2.5 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zur Rolle von miRNAs bei GPA	11
1.3 Alternative Polyadenylierung.....	12
1.4 Reportersysteme zur Darstellung von miRNA-mRNA-Interaktion	12
1.4.1 Dualer Luziferase-Reporterassay	13
1.5 Fragestellung dieser Doktorarbeit	14
2 Material	15
2.1 Reagenzien	15
2.2 Kits	15
2.3 Lösungen, Medien und Puffer	16
2.4 Enzyme.....	16
2.5 Bakterienstämme	16
2.6 Primer	17
2.7 Plasmide	17
2.8 Künstliche miRNAs	17
2.9 Zelllinien	18
2.10 Geräte	18

2.11	Computer Software.....	19
2.12	Datenbanken.....	19
3	Methoden.....	20
3.1	Datenbankrecherche	20
3.2	Quantitative PCR.....	20
3.2.1	RNA-Isolation aus <i>HeLa</i> -Zellen.....	20
3.2.2	cDNA-Synthese.....	21
3.2.3	PCR Bedingungen	21
3.3	Klonierung.....	22
3.3.1	DNA-Extraktion	22
3.3.2	Primer-Design	22
3.3.3	PCR-Amplifikation.....	23
3.3.4	Aufreinigung der PCR-Produkte	23
3.3.5	Restriktionsverdau.....	24
3.3.6	Ligation	24
3.3.7	Transformation	24
3.3.8	Identifizierung von Bakterienkolonien mit korrektem Plasmid	24
3.3.9	Miniprep, Testverdau und Sequenzierung.....	25
3.3.10	Plasmidproduktion.....	25
3.4	Transfektion von <i>HeLa</i> -Zellen	26
3.4.1	Vorbereiten der <i>HeLa</i> -Zellen	26
3.4.2	Erstellen des Transfektionsansatzes	26
3.4.3	Luziferasereaktion	27
3.5	Datenauswertung	27
4	Ergebnisse	29
4.1	Etablierung des Assays.....	29
4.1.1	Auswahl einer Zelllinie	29
4.1.2	Auswahl einer Positivkontrolle	30
4.2	Effekte der miRNA- <i>mimics</i> auf die PR3-3'UTR	32
4.3	Effekte der miRNA- <i>mimics</i> auf die alternative PR3-3'UTR.....	34

5	Diskussion	37
5.1	Etablierung des Assays.....	37
5.1.1	Auswahl der Zelllinie	38
5.1.2	Kontrollen.....	38
5.2	Effekte der miRNA- <i>mimics</i> auf die PR3-3'UTR und alternative PR3-3'UTR	39
5.2.1	Unterschiede zwischen den miRNA- <i>mimics</i> und der Negativkontrolle cel-miR-67	40
5.2.2	Unterschiede zwischen der miRNA-Wirkung auf 3'UTR und NTC.....	40
5.2.3	MiRNA- <i>mimics</i> mit Effekt auf die PR3-3'UTR.....	40
5.2.4	MiRNA- <i>mimics</i> mit Effekt auf die alternative PR3-3'UTR.....	41
5.2.5	Erklärungsmodell für die beobachteten miRNA-Effekte	42
5.3	Interpretation der Ergebnisse und Modell der Pathophysiologie	42
5.3.1	Funktion von hsa-miR-184.....	42
5.3.2	Funktion von hsa-let-7f	43
5.3.3	Funktion von hsa-miR-708.....	44
5.4	Weiterführende Experimente.....	45
5.5	Bedeutung der Ergebnisse für Diagnostik und Behandlung der GPA.....	46
6	Zusammenfassung	47
	Literaturverzeichnis.....	48
	Anhang	56
I	Ergebnisse der <i>in silico</i> -Analyse	56
II	Ergebnisse der PR3-qPCR.....	57
III	Zusätzliche Ergebnisse der Luziferaseassays	57
	Danksagung.....	60
	Erklärung.....	61

Abkürzungsverzeichnis

AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitis
ADAM17	<i>A disintegrin and metalloproteinase 17</i>
ALDOA	<i>Aldolase A</i>
AKT2	<i>RAC-beta serine/threonine-protein kinase</i>
ANCA	Anti-Neutrophilen zytoplasmatische Antikörper
cDNA	Komplementäre-DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGPA	Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FOXP1	<i>Forkhead box protein P1</i>
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
GIMAP5	<i>GTPase IMAP family member 5</i>
HeLa	Tumorzellen der Patientin Henrietta Lacks
IRF5	<i>Interferon regulatory factor 5</i>
MPA	Mikroskopische Polyangiitis
miRNA	MicroRNA
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
NTC	<i>no-target</i> -Kontrolle
NNAT	Neonatin
PR3	Proteinase 3
PCR	Polymerasekettenreaktion
RA	Rheumatoide Arthritis
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	<i>Relative light unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SSc	Systemische Sklerose
UTR	Untranslatierte Region

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 ANCA-assozierte Vaskulitiden

Rheumatische Erkrankungen sind chronisch-entzündliche Systemerkrankungen. Eine Gruppe der rheumatischen Erkrankungen sind die Vaskulitiden. Diese sind gekennzeichnet durch eine chronische Gefäßinflammation. Die Vaskulitiden werden anhand des Befallsmusters in Groß-, Mittel- und Kleingefäßvaskulitiden eingeteilt (Jennette *et al.*, 2013). Zur Gruppe der Kleingefäßvaskulitiden gehören die ANCA-assozierten Vaskulitiden (AAV), deren Besonderheit das Auftreten von Anti-Neutrophilen zytoplasmatischen Autoantikörpern (ANCA) ist. Klinisch lassen sich die ANCA-assozierten Vaskulitiden in die Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA), Mikroskopische Polyangiitis (MPA) und Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) unterscheiden (Lamprecht *et al.*, 2018). Alle drei Erkrankungen zeigen nekrotisierende Entzündungen der intraparenchymalen kleinen Gefäße. Die MPA lässt sich von der GPA durch das Fehlen von granulomatösen Gewebsentzündung differenzieren. Die EGPA ist hingegen durch die Assoziation mit Asthma und vermehrten eosinophilen Granulozyten im Blut und Gewebe charakterisiert (Jennette *et al.*, 2013).

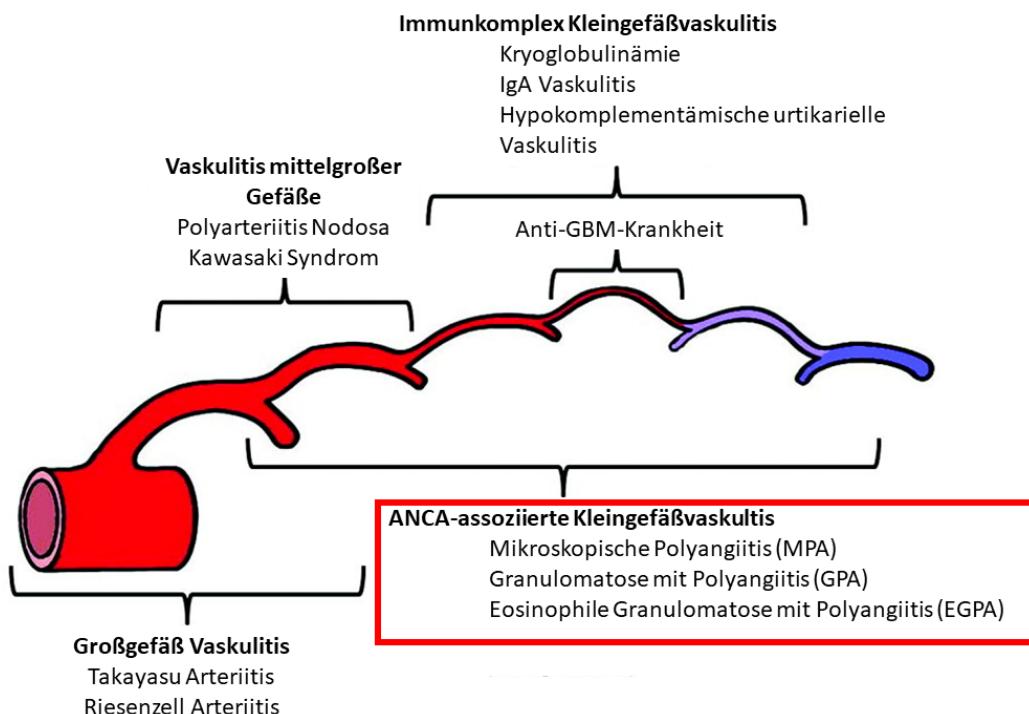


Abbildung 1: Einordnung der ANCA-assozierten Vaskulitiden (AAV) innerhalb der verschiedenen Vaskulitisformen. Abbildung verändert von Jennette *et al.*, 2013.

Die ANCA gegen typische Zielantigene der Neutrophilen sind durch ihre Krankheitsspezifität von hoher diagnostischer Wertigkeit. In der klassischen Immunfluoreszenzfärbung von fixierten Neutrophilen lassen sich die ANCA in drei verschiedene Fluoreszenzmuster einteilen: zytoplasmatisch (C-ANCA), perinuklear (P-ANCA) und atypisch (A-ANCA). Mittels ELISA ist zusätzlich die Bestimmung der Autoantigene möglich, wobei die GPA mit Anti-PR3-Antikörpern bzw. C-ANCA, hingegen die EGPA und MPA eher mit Anti-Myeloperoxidase-Antikörpern bzw. P-ANCA assoziiert sind (Hilhorst *et al.*, 2015). Eine klinisch voll ausgeprägte AAV ohne ANCA-Nachweis ist ebenfalls möglich, jedoch mit unter 10 % aller Fälle selten und präsentiert sich klinisch meist als EGPA oder MPA (Jennette & Nachman, 2017). Zur eindeutigen Einordnung der Erkrankung sollte immer der ANCA-Serotyp zusammen mit dem klinischen Phänotyp genannt werden, beispielsweise: PR3-ANCA positive GPA.

1.1.1 Granulomatose mit Polyangiitis

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), früher *Morbus Wegener* genannt, ist eine rheumatische Systemerkrankung, die unbehandelt innerhalb von Monaten zum Tode führte (Wegener, 1939; Walton, 1958). Durch frühzeitige Diagnosestellung und den Einsatz von immunsuppressiven Therapeutika konnte die Mortalität reduziert werden. Besonders bei Beteiligung der Nieren, des Gastrointestinaltrakts oder des Herzens liegt die Mortalität jedoch weiterhin über der Mortalität der Gesamtbevölkerung (Heijl *et al.*, 2017). Die Krankheit äußert sich häufig zunächst durch starkes Krankheitsgefühl mit Unwohlsein, Gelenk- und Muskelschmerzen, sowie chronischer Rhinitis oder Sinusitis (75 % aller GPA-Patienten), gefolgt von Lungen- (81 %) und Nierenbeteiligung (90 %) (Jennette & Nachman, 2017). Häufig kommt es zu einer rasch progredienten pauci-immunen Glomerulonephritis und unbehandelt zum Nierenversagen. Ebenfalls betroffen sein können: Haut, Augen, Herz, Darm, peripheres und zentrales Nervensystem (Holle *et al.*, 2011; Greco *et al.*, 2016). Lokalisierte Ausprägungen der GPA, die sich auf den oberen Respirationstrakt beschränken und ohne systemische Gefäßentzündung einhergehen, wurden ebenfalls beschrieben, sind jedoch selten (Holle *et al.*, 2010). Zur klinischen Klassifikation dienen die Definition der *Chapel Hill Consensus Conference 2012* (Jennette *et al.*, 2013) und die Klassifikationskriterien des *American College for Rheumatology 1990* (Leavitt *et al.*, 1990). Die Pathogenese der GPA ist multifaktoriell und bisher nicht vollständig aufgeklärt. Pathogenetisch relevant sind eine veränderte Expression der Proteinase 3 und die Entstehung der ANCA. Dies führt wiederum zur Stimulation von neutrophilen Granulozyten und chronischer Entzündung mit Gefäßschädigung (Korkmaz *et al.*, 2016). Eine Zusammenfassung der bisher bekannten Pathophysiologie zeigt Abbildung 2.

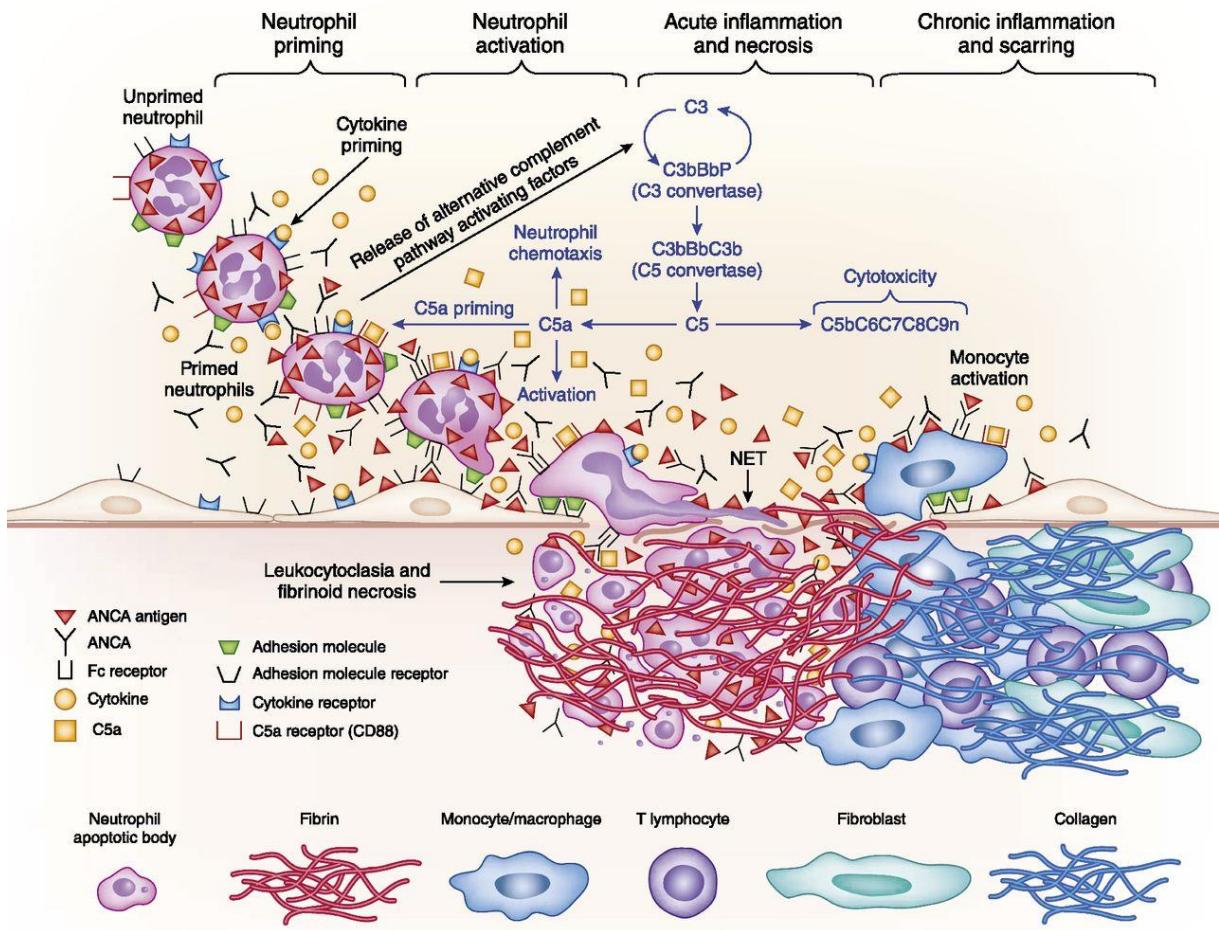


Abbildung 2: Darstellung der Pathomechanismen in der Granulomatose mit Polyangiitis

Neutrophile Granulozyten werden durch Zytokine voraktiviert und exprimieren das ANCA-Antigen Proteinase 3 auf der Zellmembran. ANCA binden an die Neutrophile und aktivieren diese, wodurch Proteinase 3 auch an die Umgebung abgegeben wird und die Neutrophile in das Gewebe einwandern. Zusätzlich wird das Komplementsystem aktiviert. Die aktivierte Neutrophile zerstören das Endothel und führen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus nekrotischen Zellen. Monozyten und Lymphozyten wandern ebenfalls in die entzündete Region ein und tragen zur Aufrechterhaltung der Entzündung bei. Abbildung entnommen aus (Jennette & Nachman, 2017).

Die Granulomatose mit Polyangiitis hat in Mitteleuropa eine jährliche Inzidenz von 34 Fällen/Million Einwohner und eine Prävalenz von 210/Million Einwohner (Hellmich *et al.*, 2021). Es tritt keine geschlechtsspezifische Häufung auf, jedoch steigt das Risiko mit zunehmendem Alter an. Die höchste Inzidenzrate wird in der Gruppe der über 55-Jährigen beobachtet (Reinhold-Keller *et al.*, 2005). Unter den ANCA-assoziierten Vaskulitiden ist die GPA in Nordeuropa die häufigste Form der Vaskulitis. In Südeuropa, Japan und China hingegen überwiegt die MPA (Watts *et al.*, 2001; Pearce *et al.*, 2017).

1.1.2 Proteinase 3

Proteinase 3, ehemals Myeloblastin, wurde 1978 erstmals beschrieben und 1990 als GPA-spezifisches Zielantigen der C-ANCA identifiziert. 1996 wurde die Kristallstruktur gelöst (Fujinaga *et al.*, 1996). PR3 ist eine Serinprotease, die in humanen neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert wird. Der Großteil der PR3 wird zusammen mit anderen Proteasen in den azuophilen Granula von neutrophilen Granulozyten gespeichert (Campanelli *et al.*, 1990). Ein kleinerer Teil der PR3 liegt jedoch konstitutionell membrangebunden auf der Oberfläche ruhender neutrophiler Granulozyten vor (Halbwachs-Mecarelli *et al.*, 1995). Unter dem Einfluss von Zytokinen wird die PR3-Expression auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten gesteigert (sog. *priming*). Die Bindung von ANCA an diese membrangebundene PR3 führt über den PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg zur Aktivierung der Granulozyten und zur Freisetzung der azuophilen Granula (Kettritz, 2012). Die vorzeitige ANCA-vermittelte, pathologische Degranulierung der neutrophilen Granulozyten induziert die Endothelläsion und Vaskulitis. Die frei gewordenen Proteasen bewirken einen unselektiven Abbau von Proteinen in entzündetem Gewebe. Im Falle einer Infektion trägt die PR3 physiologischerweise zur effektiven natürlichen Immunantwort bei, dysreguliert führt sie hingegen zum Abbau von extrazellulärer Matrix und zum Gewebsuntergang (Pham, 2006).

Die mRNA von Proteinase 3 ist 987 Nukleotide lang und ihre Sequenz in der NCBI unter NM_002777 hinterlegt. Sie besteht aus fünf Exons mit einer 24 Nukleotide langen 5'UTR und einer 206 Nukleotide langen 3'UTR.

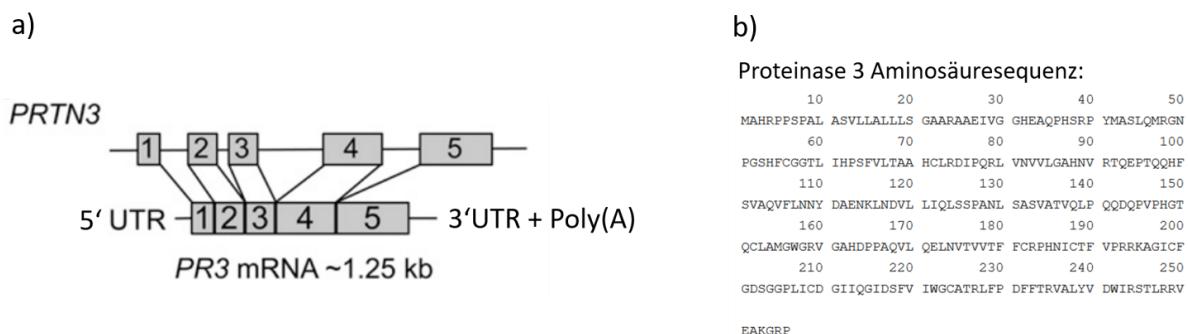


Abbildung 3: a) Darstellung des genetischen Locus der Proteinase 3 und der mRNA bestehend aus 5'UTR, fünf Exons sowie einer 3'UTR und einem Poly(A)-Schwanz (Abbildung verändert von McInnis *et al.*, 2015). b) Aminosäuresequenz der Proteinase 3 (Entnommen aus: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_002768.3, 31.05.2021).

Es wird vermutet, dass eine veränderte Expression der PR3 zur Bildung von ANCA und zur Entstehung der GPA beiträgt. So wurden erhöhte PR3-mRNA-Spiegel bei GPA-Patienten gefunden (Ohlsson *et al.*, 2005), außerdem konnte gezeigt werden, dass ein auf eine transkriptionelle Dysregulation hinweisender erhöhter PR3-mRNA-Spiegel mit einer aktiven Vaskulitis assoziiert ist (Yang *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2020). Eine Ursache der transkriptionellen Dysregulation ist die

epigenetische Modifikationen des DNA-Methylierungsmusters im Bereich von inhibierenden Genloci (Ciavatta *et al.*, 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass in Neutrophilen von GPA-Patienten nicht bloß die Expression der PR3-mRNA erhöht war, sondern auch eine alternative mRNA mit verlängerter (286 Basen) 3‘ untranslatierter Region (3‘UTR) gebildet wird (McInnis *et al.*, 2015). Siehe dazu Abschnitt 1.3.

1.2 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind 21-23 Nukleotide lange, nicht kodierende einzelsträngige RNA-Moleküle, die durch komplementäre Bindung an mRNAs die Proteinexpression inhibieren können. Die erste miRNA wurden 1993 in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) entdeckt (Lee, Feinbaum & Ambros, 1993). Seitdem wurden unzählige miRNAs in verschiedenen eukaryotischen Modellorganismen, sowie in Pflanzen und dem Menschen gefunden (Bartel, 2004). Im Jahr 2019 waren in der miRBase Datenbank 2654 miRNAs verzeichnet, wobei durch Annotationsfehler von einer Anzahl von ca. 600 echten humanen miRNAs ausgegangen wird (Fromm *et al.*, 2015; Bartel, 2018; Kozomara, Birgaoanu & Griffiths-Jones, 2019). Die Relevanz von miRNAs für Wissenschaft und Klinik lässt sich mit Hilfe der großen Anzahl von neu erschienen wissenschaftlichen Artikeln auf dem Gebiet verdeutlichen: Im Jahre 2018 waren es ca. 11 000 (Bonneau *et al.*, 2019).

Im Gegensatz zu transkriptionellen Modifizierungen stellt die translationale Hemmung durch miRNAs eine schnelle Antwort auf akute Erfordernisse dar. Neben Gewebedifferenzierung und -homöostase sind miRNAs auch an der Antwort auf zellulären Stress beteiligt. So sind Verletzungen, Hypoxie oder Infektionen starke miRNA-Induktoren (Bandara, Michael & Gleadle, 2017; Hirschberger, Hinske & Kreth, 2018). Der Effekt einer einzelnen miRNA auf eine mRNA-Bindungsstelle ist typischerweise gering. So liegt die Effektstärke in der Regel unter 50 %, oft sogar unter 20 % (Selbach *et al.*, 2008). Eine miRNA kann jedoch an tausende verschiedene mRNAs binden und mehrere miRNAs können gleichzeitig auf eine mRNA wirken. Die Effekte können sich dabei kooperativ verstärken (Sætrom *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass ca. 60 % aller mRNAs evolutionär konservierte Bindungsstellen für miRNAs aufweisen (Friedman *et al.*, 2009). Durch zellspezifische und temporär veränderliche miRNA-Netzwerke kann somit die gesamte Proteinexpression eines Organismus reguliert werden (Selbach *et al.*, 2008). Dabei können veränderte miRNA-Expressionen Pathologien wie beispielsweise Tumore begünstigen (Cimmino *et al.*, 2005), als auch Reaktionen des Organismus auf pathologische Zustände darstellen (Wang *et al.*, 2013).

Das Verständnis der miRNA-Pathophysiologie hat große diagnostische und therapeutische Relevanz. Einen Überblick über die Nutzung von miRNAs als Biomarker bietet De Guire *et al.*, 2013. Einige miRNA-Therapeutika wie zum Beispiel *Miravirsen* (miR-122 AntagomiR) zur Behandlung der Hepatitis C werden bereits in klinischen Studien an Menschen erprobt (Bonneau *et al.*, 2019c). Eine

aktuelle Übersicht über den Stand der klinischen Studien mit miRNA-Therapeutika bietet Chakraborty *et al.*, 2021.

1.2.1 Nomenklatur der miRNAs

Bis auf wenige historisch gewachsene Ausnahmen (wie let-7) werden miRNAs nach der Reihenfolge der Entdeckung durchnummieriert und bekommen ein speziespezifisches Präfix z.B. hsa-miR-184 für *Homo sapiens* MicroRNA 184. Die Großschreibweise miR bedeutet hierbei, dass es sich um die reife miRNA handelt. Mit dem kleingeschriebenen mir wird hingegen der zugrundeliegende Genabschnitt oder ein Vorläufermolekül bezeichnet. MiRNAs verschiedener Spezies mit sehr ähnlicher Sequenz werden in der Regel äquivalent nummeriert. MiRNAs, die sich nur um ein Nukleotid von einer anderen miRNA innerhalb der Spezies unterscheiden, bekommen den gleichen Namen, ergänzt durch einen zusätzlichen Buchstaben wie zum Beispiel hsa-miR-29 und hsa-miR-29a. Der aus einer Vorstufe entstehende Strang mit dem stärksten Effekt wird so wie beschrieben als miR bezeichnet, der dabei ebenfalls entstehende Strang mit geringerem oder keinem Effekt wird miRNA „Stern“ genannt. So entstehen aus dem Vorläufermolekül hsa-mir-214 die beiden miRNAs hsa-miR-214 und hsa-miR-214*. Da jedoch nicht immer klar ist, welcher der Strang mit dem vorherrschenden Effekt ist, ist es sinnvoller die beiden Stränge durch die Beschreibung ihrer Enden als 5p und 3p zu charakterisieren. Wird auf die Bezeichnungen verzichtet, so handelt es sich in der Regel um den 5p-Strang (Ambros *et al.*, 2003; Griffiths-Jones *et al.*, 2006; miRBase, 2018).

1.2.2 Prozessierung von humanen miRNAs

MiRNAs werden wie mRNAs zunächst durch die Polymerase II im Zellkern DNA-abhängig transkribiert. Im Gegensatz zu mRNAs werden für die Bildung von miRNAs meist nichtkodierende primäre Transkripte verwendet. Aber auch Introns, die bei der mRNA-Bildung heraus geschnitten werden, können zu miRNAs prozessiert werden (Lee *et al.*, 2002). Die transkribierten RNA-Moleküle, sogenannte Pri-miRNAs, sind deutlich länger als die fertigen miRNAs und bilden durch komplementäre Nukleotide intramolekulare Haarnadel-Strukturen aus. Die Pri-miRNAs werden noch im Zellkern durch den Drosha Endonuklease Komplex zu einer ca. 60 Nukleotide langen Pre-miRNA gekürzt und von Exportin 5 aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert (Lee *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2003). Im Zytoplasma werden die Pre-miRNAs durch das Enzym Dicer zu reifen doppelsträngigen miRNAs prozessiert (Hutvagner *et al.*, 2001). Die doppelsträngigen miRNAs werden daraufhin vom „RNA- induced silencing complex“ (RISC) gebunden. Über Argonaut Proteine, die im RISC enthalten sind, werden mRNAs, die komplementär zur Führungsstrang-miRNA sind, inhibiert (Hammond *et al.*, 2001). Der im Zytoplasma verbleibende andere Strang wird als miRNA* bezeichnet und wird in der Regel ohne Effekt auf die Zelle abgebaut. Meistens handelt es sich beim Führungsstrang um den 5P-Strang, in seltenen Fällen kann hingegen auch der 3P-Strang an Argonaut und somit an

komplementäre mRNAs binden (Hammond, 2015). Die Erkennung und Bindung der miRNA an ihre Ziel-mRNA ist komplex und wird im Kapitel 1.2.3 näher erläutert.

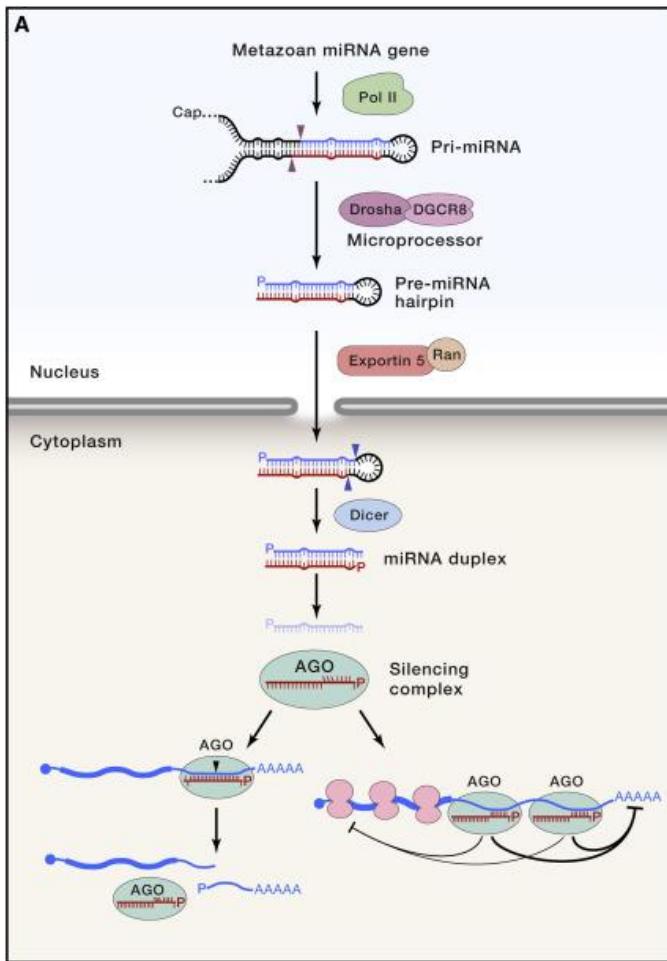


Abbildung 4: Entstehung und Prozessierung von miRNAs in der Zelle (Bartel, 2018)

Im Zellkern werden lange Pri-miRNAs durch die Polymerase II transkribiert. Nach der Ausbildung von Haarnadelstrukturen schneidet der Drosha-Komplex die Enden der Pri-miRNA. Es entsteht die ca. 60 Nukleotide lange Pre-miRNA, die durch Exportin 5 in das Zytosplasma transportiert wird. Dort schneidet Dicer die Pre-miRNA zu zwei reifen miRNAs wobei nur eine von RISC mit dem Protein AGO gebunden wird. RISC bindet komplementäre mRNAs und inhibiert die mRNA durch Hemmung der Translation oder durch Destabilisierung des Poly-A-Schwanzes.

1.2.3 Bindung von miRNAs an Ziel-mRNAs

MiRNAs binden typischerweise an die 3' untranslatierte Region (UTR), die sich dem kodierenden Bereich einer mRNA anschließt (Bartel, 2018). MiRNA-Bindung an die 5'UTR oder auch im kodierenden Bereich sind die Ausnahme (Hausser & Zavolan, 2014). Zur Bindung besitzen reife miRNAs an ihrem 5' Ende eine sogenannte *seed*-Region, die über mindestens 6 Nukleotide mit der mRNA komplementär sein muss. Der Großteil der bisher gefundenen miRNAs besitzt einen 7 oder 8 Nukleotide langen komplementären Abschnitt bzw. *seed*. Dabei gilt: Je besser die Bindung, desto stärker die Effekte (Grimson *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2015). Außer diesen klassischen bzw. kanonischen *seeds*, gibt es auch wie in Abbildung 5 dargestellt alternative Konstellationen, bei denen

die Nukleotide nicht vollständig komplementär sein müssen, sondern weitere komplementäre Stellen die unvollständige Bindung ausgleichen (Bartel, 2018). Von „small interfering RNAs“ (siRNA) unterscheiden sich miRNAs durch die Art der Bindung. Im Gegensatz zu miRNAs binden siRNAs ihre Zielsequenz auf ganzer Länge perfekt komplementär und erzielen dadurch eine deutlich stärkere direkte Inhibition der Ziel-mRNA. Weitere Faktoren für die Bindungsfähigkeit und somit Effektivität von miRNAs sind die Lage der Bindungsstellen in der 3'UTR, sowie die Zugänglichkeit der mRNA. So sind Bindungsstellen nahe der Enden der 3'UTR effektiver als Bindungsstellen in der Mitte der UTR (Hoffman *et al.*, 2016). Je nach Art der Bindung kommt es zu verschiedenen Arten der mRNA-Repression. Die Destabilisierung der Poly-A-Kette und somit der Abbau der mRNA ist für 66 – 90 % der miRNA-Effekte verantwortlich, wogegen die Translationsinhibition eine eher untergeordnete Rolle spielt (Eichhorn *et al.*, 2014).

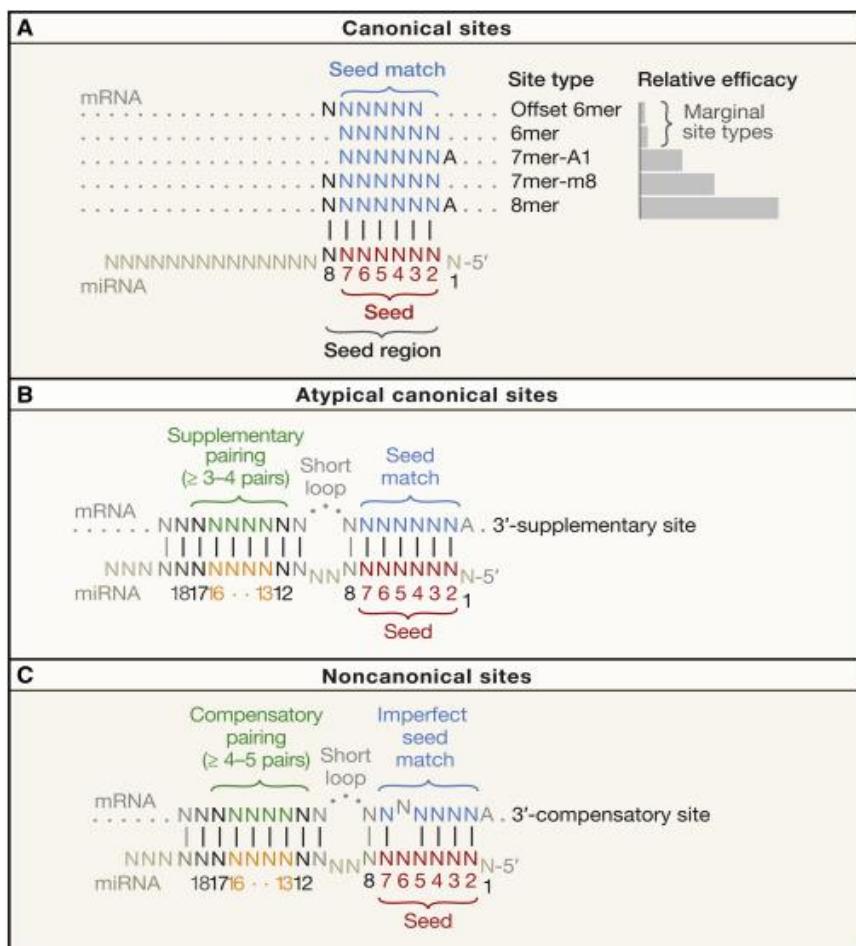


Abbildung 5: MiRNA-Bindungsstellen (Bartel, 2018)

(A) MiRNAs binden mit ihrer 5' *seed*-Region an komplementäre mRNAs, meist in deren 3'UTR. Die komplementären Bereiche (*seed*) müssen dabei nur mindestens 6 Nukleotide lang sein, wobei 7 und 8 komplementäre Nukleotide am häufigsten sind und stärkere Effekte hervorrufen. Andere, nicht klassische Bindungen sind ebenfalls beschrieben und in (B) und (C) dargestellt. Dabei spielen meist zusätzliche komplementäre Bereiche bei der Bindung eine Rolle. Diese Arten von miRNA-mRNA-Wechselwirkungen werden in den Vorhersagemodellen meist weniger stark berücksichtigt.

Programme zur Vorhersage von miRNA-mRNA-Wechselwirkungen wie TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/, letzter Zugriff 27.03.2020) oder miRDB (<http://mirdb.org/index.html>, letzter Zugriff 27.03.2020) nutzen die bisher bekannten Bindungsmuster für ihre Algorithmen, wobei kanonische und evolutionär konservierte Stellen meist stark gewichtet werden (Tarang & Weston, 2014). Viele Wechselwirkungen lassen sich über diese Werkzeuge erfolgreich vorhersagen, jedoch sind noch nicht alle Bindungskriterien erforscht und somit sind weder falsch positive noch falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen. Werkzeuge wie mirDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>, letzter Zugriff 17.01.2021) kombinieren mehrere dieser Vorhersageprogramme und sind für einen besseren Überblick nützlich. Experimentell gesicherte miRNA-mRNA-Wechselwirkungen lassen sich in Datenbanken, wie miRTarBase (<http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/php/index.php>, letzter Zugriff 06.02.2021) finden. Für einen umfassenden Überblick über alle miRNA bezogenen Computerprogramme siehe (Tarang & Weston, 2014).

1.2.4 MiRNAs bei rheumatischen und chronisch entzündlichen Erkrankungen

MiRNAs regulieren die Entwicklung und Homöostase des Immunsystems. Gleichzeitig verändern Entzündungsprozesse die lokale Expression von miRNAs (O'Connell *et al.*, 2010). Im physiologischen Fall wird durch miRNAs schon zu Beginn der Inflammation ihre Terminierung festgelegt. Dafür wird ein antiinflammatorisches Programm mit Reparaturmechanismen zur Vermeidung von Organschäden und von unkontrollierter anhaltender Entzündung aktiviert (Anderson, 2010). Veränderte miRNA-Spiegel können hingegen zur Immundysregulation führen und beispielsweise zur Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beitragen. Dabei lassen sich die veränderten miRNA-Expressionen nicht bloß auf die Entzündung zurückführen, sondern sind auch in nicht entzündetem Gewebe zu finden. Sie können somit als Biomarker genutzt werden (Fasseu *et al.*, 2010). Im Mittelpunkt der immunologischen Forschung stehen miR-155 und miR-146a. Diese miRNAs regulieren Lymphozyten sowie die Zytokinproduktion und führen in knock-out Mäusen zu ausgeprägten Immundefekten (Hirschberger, Hinske & Kreth, 2018). Doch auch viele andere miRNAs wurden in den letzten Jahren mit dem Immunsystem, sowie mit rheumatologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Besonders bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) (Vicente *et al.*, 2016), Systemischer Sklerose (SSc) (Tsou & Sawalha, 2017) und dem Systemischen Lupus Erythematodes (SLE) (Shen *et al.*, 2012) wurde die Rolle von miRNAs bereits ausgiebig untersucht. Bei allen drei Krankheiten tragen veränderte miRNA-Expressionsmuster zur Ausbildung von Pathologien bei und gelten deshalb als attraktive Ziele von neuen Medikamenten. Einen Überblick über bisher bekannte veränderte miRNA-Expressionen bei rheumatischen Erkrankungen gibt Abbildung 6.



Abbildung 6: Darstellung nichtkodierender RNAs, die bei rheumatologischen Erkrankungen verändert exprimiert werden (Chen *et al.*, 2019).

Dargestellt sind miRNAs und weitere nichtkodierende RNAs für den jeweils untersuchten Zelltyp bzw. Gewebetyp. Pfeil nach oben = erhöhte Expression; Pfeil nach unten = erniedrigte Expression; SLE = Systemischer Lupus Erythematodes; RA = Rheumatoide Arthritis; SSc = Systemische Sklerose; IIM = Idiopathische entzündliche Myopathie; pSS = Sjögren Syndrom.

Zu miRNAs bei ANCA-assozierter Vaskulitis wurde hingegen bisher wenig publiziert. In einer schwedischen Studie wurde gezeigt, dass bei AAV eine veränderte miRNA-Expression vorliegt. Dabei beschränkten sich die Autoren auf die Untersuchung von 32 miRNAs, die zuvor bereits bei Studien mit SLE Patienten untersucht wurden. Mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) wurden Plasmaproben und periphere Leukozyten untersucht, wobei in AAV-Patienten eine gesteigerte miRNA-Expression für die miRNAs miR-29a, -34a, -142-3p und -383, sowie eine verringerte Expression für die miRNAs miR-20a, -92a und -221 beschrieben wurde (Skoglund *et al.*, 2015). Eine weitere Gruppe konnte zeigen, dass miR-142-3p in regulatorischen T-Zellen von GPA-Patienten vermehrt exprimiert wird und deren Funktion unterdrückt (Dekkema *et al.*, 2019). Eine andere Arbeit befasste sich mit der Wirkung der miRNA 634 auf die Expression von „a disintegrin and metalloproteinase 17“ (ADAM17) (Bertram *et al.*, 2015). ADAM17 ist eine Metalloproteinase, die Gefäßentzündungen durch das Zerschneiden von endothelialen Membranproteinen verstärkt. Die Autoren konnten zeigen, dass miR-634 zu einer gesteigerten ADAM17 Expression beiträgt. Sie vermuteten, dass ADAM17 eine Rolle bei ANCA-assozierter Vaskulitis spielt. Des Weiteren kam eine kürzlich veröffentlichte Studie zu dem Ergebnis, dass die Konzentration von miR-126 im Plasma von Patienten mit ANCA-assozierter Vaskulitis stark verringert ist. Im Verlauf der Therapie stieg die Konzentration an miR-126, blieb jedoch im Vergleich zu gesunden Probanden erniedrigt. Nach Meinung der Autoren könnte miR-126 als Marker für Endothelschaden bei ANCA-assozierter Vaskulitis fungieren (Scullion *et al.*, 2021). Eine vermutete Wirkung von hsa-miR-941, die indirekt zu

einer Überexpression von PR3 in neutrophilen Granulozyten von GPA-Patienten führt, wurde widerlegt, da hsa-miR-941 nicht vermehrt in Neutrophilen von GPA-Patienten vorkommt (Svendsen *et al.*, 2016). Zur direkten Regulation der PR3 durch miRNAs gibt es bislang keine Veröffentlichungen.

1.2.5 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zur Rolle von miRNAs bei GPA

Schinke et al. (Schinke *et al.*, 2013) untersuchten mit Hilfe eines miRNA-Microarrays Nasenschleimhautproben von GPA-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und Probanden mit chronischer Sinusitis. Von den 847 getesteten miRNAs konnten dabei 21 miRNAs mit einer mehr als zweifach veränderten Expression bei den GPA-Patienten identifiziert werden (Abbildung 7). 16 miRNAs waren im Vergleich zur Kontrolle unterexprimiert, fünf waren überexprimiert. Besonders auffällig war eine 13-fach erhöhte Expression von miR-184. Recherchen in der mirDIP-Datenbank ergaben, dass PR3 ein potenzielles Ziel einiger der identifizierten miRNAs ist (Tabelle 22). Sowohl verringerte als auch erhöhte miRNA-Expression von PR3-regulierenden miRNAs wäre pathophysiologisch denkbar. Erniedrigte miRNA-Expression könnte eine weitere Ursache der transkriptionellen Dysregulation der PR3 sein (siehe Kapitel 1.1.2), erhöhte miRNA-Expression könnte hingegen eine Reaktion des Körpers auf eine pathologisch erhöhte PR3-Expression darstellen.

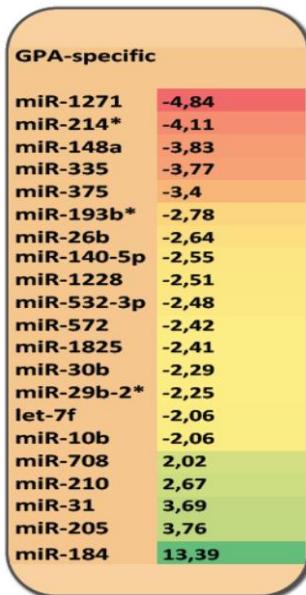


Abbildung 7: Ergebnisse des miRNA-Microarrays von Schinke *et al.*, 2013.

Die abgebildeten 21 miRNAs weisen eine mehr als zweifach veränderte Expression bei GPA-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Sinusitis auf. Die rechte Spalte zeigt die Stärke der Expressionsveränderung. Hsa-miR-1271 ist mit einer um das 4,84-fach reduzierten Expression bei GPA die am stärksten herunterregulierte miRNA. Hsa-miR-184 ist mit einer um den Faktor 13,39 erhöhten Expression die am stärksten heraufregulierte miRNA.

1.3 Alternative Polyadenylierung

Alternative Polyadenylierung trägt maßgeblich zur Diversität des Transkriptoms und zur Differenzierung von Geweben bei (Wang *et al.*, 2008). Die Bildung von unterschiedlich langen 3'UTRs der gleichen mRNA kann die mRNA-Lokalisation, ihre Stabilität und die Translationseffizienz beeinflussen (Carpenter *et al.*, 2014). Neben RNA-bindenden Proteinen sind hierfür vor allem miRNAs verantwortlich, die unterschiedlich an die verschiedenen 3'UTRs binden. Welches Polyadenylierungssignal in einer Zelle verwendet wird und wie der Auswahlmechanismus funktioniert ist bisher nicht vollständig aufgeklärt (Gruber & Zavolan, 2019). Die Nutzung von distalen Polyadenylierungssignalen gilt jedoch allgemein als Zeichen von Zelldifferenzierung und ermöglicht die Bindung von zusätzlichen miRNAs (Chen *et al.*, 2017). In schnell proliferierenden Zellen werden dagegen häufiger proximale Polyadenylierungsstellen verwendet, was meist zu einer erhöhten mRNA-Expression führt. In einigen Fällen kann allerdings auch die kürzere 3'UTR einem verstärken miRNA-Effekt unterliegen (Hoffman *et al.*, 2016).

Ca. 20 % aller 3'UTRs des Menschen weisen mehrere Polyadenylierungsstellen auf (Wang *et al.*, 2008). Alternative 3'UTRs konnten bereits bei vielen onkologischen Erkrankungen, aber auch bei einigen immunologischen und rheumatologischen Erkrankungen nachgewiesen werden (Gruber & Zavolan, 2019). So konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Systemischem Lupus Erythematodes eine verlängerte 3'UTR von „GTPase IMAP family member 5“ (GIMAP5) sowie eine verkürzte 3'UTR von „Interferon regulatory factor 5“ (IRF5) vorkommen (Graham *et al.*, 2007; Hellquist *et al.*, 2007).

Auch in neutrophilen Granulozyten von GPA-Patienten wurden zwei Isoformen der PR3-3'UTR nachgewiesen. Neben der normalen 3'UTR (206 Nukleotide) wurde eine alternative 3'UTR (286 Nukleotide) identifiziert (McInnis *et al.*, 2015). Die Hypothese einer veränderten Regulation der alternativen 3'UTR durch RNA-bindende Proteine oder miRNAs wurde von den Autoren gestellt, jedoch nicht weiter untersucht.

1.4 Reportersysteme zur Darstellung von miRNA-mRNA-Interaktion

Nach der Entdeckung von veränderten miRNA-Profilen in einer Zellpopulation mittels Hochdurchsatzmethoden wie Microarrays oder Next Generation Sequencing wird in der Regel das direkte Ziel der miRNAs gesucht. Oft werden dazu zunächst bioinformatische Ansätze gewählt (wie im Abschnitt 1.2.3 beschrieben). Zur Validierung der Ziel-mRNAs werden schließlich meist Reporterassays wie der duale Luziferaseassay verwendet. Eine ausführliche Darstellung der verschiedenen Methoden zur miRNA-Analyse bietet (Svoboda, 2015).

1.4.1 Dualer Luziferase-Reporterassay

Luziferase-Reporterassays basieren auf der enzymatischen Umsetzung von chemischen, energiereichen Verbindungen zu Licht. In der Natur kommt die Luziferase zum Beispiel in Leuchtkäfern vor. Im Labor kann über die Stärke der Lichtemission die Menge der Luziferase ermittelt werden. Für den dualen Luziferase-Ansatz wird eine *Renilla*-Luziferase mit einer *Firefly*-Luziferase auf einem Plasmid kombiniert. Die *Renilla*-Luziferase wird nicht verändert und fungiert als Normierung der Transfektion. Durch ihre konstitutive Expression werden sich unterscheidende Transfektionseffizienzen herausgerechnet. Hinter die *Firefly*-Luziferase wird die zu untersuchende Sequenz, in der Regel die 3'UTR der Ziel-mRNA, eingefügt. Das Plasmid wird anschließend in eine Zelllinie transfiziert und von den Zellen transkribiert. Aus der entstehenden mRNA werden Luziferase-Proteine gebildet. Bindet eine miRNA an die 3'UTR, die an die *Firefly*-mRNA gekoppelt wurde, so wird die *Firefly*-mRNA herunter reguliert (Abbildung 8). Die Enzymaktivität und somit die Lumineszenz der *Firefly*-Luziferase nimmt entsprechend ab, wohingegen die Aktivität der *Renilla*-Luziferase konstant bleibt. Der Quotient aus *Firefly*/*Renilla*-Aktivität bei Zugabe einer miRNA-Probe dient somit zur Darstellung des Effekts der miRNA auf die 3'UTR der Ziel-mRNA. Zur Normierung wird der *Firefly*/*Renilla*-Quotient mit dem Quotienten einer miRNA ohne Zielsequenz bzw. einer Negativkontrolle verglichen.

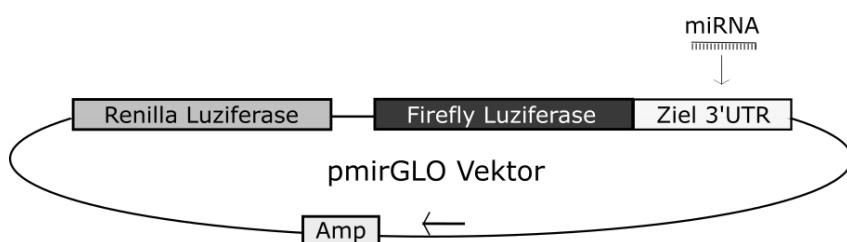


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung des pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector

Renilla- und *Firefly*-Luziferase sind auf einem Plasmid kodiert, besitzen jedoch jeweils einen eigenen Promotor und ein Polyadenylierungssignal, sodass zwei voneinander unabhängige mRNAs gebildet werden. Über eine *multiple cloning site* hinter der *Firefly*-Luziferase kann die 3'UTR der zu untersuchenden mRNA eingebracht werden. Bindet eine miRNA an diese Ziel-3'UTR, verringert sich die *Firefly*-Enzymaktivität im Vergleich zur *Renilla*-Enzymaktivität. Amp = Ampicillin-Resistenzgen.

1.5 Fragestellung dieser Doktorarbeit

Da die Pathogenese der GPA weiterhin nur unzureichend verstanden ist, insbesondere wie es zu der GPA-spezifischen Bildung von PR3-ANCA kommt, war es das Ziel dieser Arbeit die regulatorische Funktion von miRNAs auf die PR3-mRNA zu untersuchen. Vorarbeiten von Schinke et al. ergaben veränderte Expressionen von 21 miRNAs in der Nasenschleimhaut von GPA-Patienten. Für einige dieser miRNAs wurde die PR3-mRNA *in silico* als Zielstruktur identifiziert. Ob die Proteinase 3 tatsächlich ein Ziel dieser miRNAs ist, war unklar. Um dies herauszufinden sollte in dieser Arbeit ein Luziferaseassay aufgebaut werden, der die verminderte mRNA-Expression nach Bindung von miRNAs darstellen kann. Dazu musste zunächst eine geeignete Zelllinie gewählt werden. Dann sollten miRNAs mit experimentell bestätigten mRNA-Zielen als Positivkontrolle gefunden werden. Anschließend sollten die 3'UTRs der potenziellen Positivkontrollen und die 3'UTR von PR3 in ein Luziferase-Reporterplasmid kloniert, zusammen mit synthetischen miRNAs in die Zellen transfiziert und ein dualer Luziferaseassay durchgeführt werden. Nach Etablierung des Assays sollten die Effekte der miRNAs hsa-miR-184, hsa-miR-214-5p und hsa-miR-708 auf die PR3-mRNA untersucht werden, da für sie bereits Vorarbeiten der Gruppe bestanden. Im Laufe der Versuche wurde die Fragestellung auf alle 21 miRNAs erweitert. Da auch eine alternative 3'UTR in GPA-Patienten beschrieben wurde (siehe Kapitel 1.2.4 und 1.3), stellte sich zusätzlich die Frage, ob diese verlängerte 3'UTR das Ziel anderer miRNAs darstellt. Auch diese Frage sollte mit Hilfe des Luziferaseassays beantwortet werden.

2 Material

2.1 Reagenzien

Agar-Agar	AppliChem, Damstadt
Agarose Wide Range	Serva, Heidelberg
AmpliTaq Puffer I mit 15 mM MgCl ₂	Applied Biosystems, Waltham, USA
Ampicillin Natriumsalz BioChemica	AppliChem, Darmstadt
Bovines Serum Albumin	PAN-Biotech, Aidenbach
CutSmart Puffer (10x)	NEB, Ipswich, USA
DharmaFECT Duo Transfection Reagent	Dharmacon, Lafayette, USA
dNTP Mix	Life Technologies, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNazol	Thermo Fisher, Waltham, USA
Ethanol	Th. Geyer, Renningen
Ethylenediamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Pan Biotech, Aidenbach
Gel Loading Dye Purple (6x)	NEB, Ipswich, USA
GelRed 10000x	Biotium, Fremont, USA
GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
D-Glucose	Sigma, Steinheim
L-Glutamin	PAN-Biotech, Aidenbach
Glycin	Biomol, Hamburg
Glycerol	MP Biomedicals, Eschwege
Hefeextrakt für Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
PBS (steril)	PAN-Biotech, Aidenbach
Penicillin (10000 U/ml), Streptomycin (10 mg/ml)	PAN-Biotech, Aidenbach
Qiazol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden
Tris	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween20	Sigma Aldrich, Steinheim
Wasser (nukleasefrei, DEPEC behandelt)	Carl Roth, Karlsruhe

2.2 Kits

NucleoSpin Gel and PCR clean-up	Macherey-Nagel, Düren
QIAprep Spin Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Quick Ligation Kit	NEB, Ipswich, USA
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega, Madison, USA
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
- 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	

- 10x miScript Universal Primer	
- 10x miScript Primer Assay	
miScript II RT Kit	Qiagen, Hilden
- 5x miScript HiFlex Puffer	
- 10x miScript Nucleics Mix	
- miScript Reverse Transcriptase Mix	

2.3 Lösungen, Medien und Puffer

Ampicillin	50 mg/ml in dH2O
LB Medium	1 % NaCl; 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt in dH2O
LB-Amp Medium	LB Medium; 100 mg/l Ampicillin
LB Agar Platten	1.5 % Agar-agar in LB Medium
S.O.C. Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
50 x TAE	2 M Tris; 1 M Essigsäure; 0.05 M EDTA, pH 8.5
TE Puffer	10 mM Tris-HCL, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0
Transfektionsmedium	OptiMEM Reduced Medium w/o phenol red (Thermo Fisher, Waltham, USA)
Zellkulturmedium DMEM	VLE Dulbecco's MEM (Biochrom, Berlin); 10 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin
Zellkulturmedium RPMI	RPMI 1640 mit Glutamax (Thermo Fisher, Waltham, USA), 10 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin

2.4 Enzyme

AmpliTaq DNA Polymerase [5 U/µl]	Applied Biosystems, Waltham, USA
T4-DNA-Ligase [2000 U/µl]	NEB, Ipswich, USA
AvrII [5 U/µl]	NEB, Ipswich, USA
NheI-Hf [20 U/µl]	NEB, Ipswich, USA
SallI-Hf [20 U/µl]	NEB, Ipswich, USA

2.5 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i>	5-alpha competent <i>E. coli</i> C2987 (NEB, Ipswich, USA)
-------------------------	--

2.6 Primer

Tabelle 1: Primer für die quantitative PCR

Primer Name	Sequenz
hPR3_fwd	CTCGAGGCAGATCTTGGAC
hPR3_rev	TTATTGAGGTACGGTGGGG
18S_rRNA_fwd	GTAACCCGTTGAACCCATT
18S_rRNA_rev	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

Tabelle 2: Primer zum Klonieren der *inserts*

Arbeitsname des <i>inserts</i>	Primer Name	Sequenz
PR3	PR3_NheI_AvrII_fwd	actggctagcctaggACCGCCCCTCCCACAGCGCT
	PR3_Sall_rev(2)	actggtcgacGGAGTTCAACGTTATTGAGGTACGGT GGGG
PR3_lang	PR3_NheI_AvrII_fwd	actggctagcctaggACCGCCCCTCCCACAGCGCT
	PR3_long_Sall_rev	actggtcgacCCCAGGGACCTCCCTGGTCC
ADAM17	ADAM17_NheI_AvrII_fwd	actggctagcctaggAACCTAACCAACCTACCTAC
	ADAM17_Sall_rev	actggtcgacTAACTGCCCTCAAATTAC
ALDOA	ALDOA_NheI_AvrII_fwd	actggctagcctagg GCGGAGGTGTTCCCAGG
	ALDOA_Sall_rev	actggtcgacCTTAAATAGCTGTTA
FOXP1	FOXP1_NheI_AvrII_fwd	actggctagcctaggTTTCCGATTAGGCTTTGG
	FOXP1_Sall_rev	actggtcgacCTGTCTGGCTACTGC
AKT2	AKT2_NheI_AvrII_fwd	actggctagcctaggTCCTCTGTGCGATGTTG
	AKT2_Sall_rev	actggtcgacGAAGACGAGGAGAAAGGCC
NNAT	NNAT_NheI_AvrII_fwd	actggctagcctaggGGCCCCAGCTCCCAG
	NNAT_Sall_rev	actggtcgacCGCCTCTACTGCACCGC

Tabelle 3: Primer zur Sequenzierung

Primer Name	Sequenz
Seq_pmirGLO_fwd	CCAAGAAGGGCGGCAAGATC
Seq_pmirGLO_rev	GCAGCCGGATCAGCTTGCATG

2.7 Plasmide

pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector

Promega, Madison, USA

2.8 Künstliche miRNAs

Tabelle 4: Miranda miRNA-*mimics* von Dharmacon

Name der reifen miRNA	Datenbankzugriff	Sequenz der miRNA
hsa-miR-122-5p	MIMAT0000421	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
hsa-miR-1271-5p	MIMAT0005796	CUUGGCACCUAGCAAGCACUCA
hsa-miR-214-5p	MIMAT0004564	UGCCUGUCUACACUUGCUGUGC
hsa-miR-148a-5p	MIMAT0004549	AAAGUUUCUGAGACACUCCGACU

hsa-miR-335-5p	MIMAT0000765	UCAAGAGCAUAACGAAAAAUGU
hsa-miR-375	MIMAT0000728	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
hsa-miR-193b-5p	MIMAT0004767	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA
hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU
hsa-miR-140-5p	MIMAT0000431	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG
hsa-miR-1228-3p	MIMAT0005583	UCACACCUGCCUCGCC
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	CCUCCCACACCAAGGCUUGCA
hsa-miR-572	MIMAT0003237	GUCCGCUCGGCGGUGGCCA
hsa-miR-1825	MIMAT0006765	UCCAGUGCCCUCUCC
hsa-miR-30b-5p	MIMAT0000420	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU
hsa-miR-29b-2-5p	MIMAT0004515	CUGGUUCACAUUGGUGGCUUAG
hsa-let-7f-5p	MIMAT0000067	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
hsa-miR-10b-5p	MIMAT0000254	UACCCUGUAGAACCGAAUUGUG
hsa-miR-708-5p	MIMAT0004926	AAGGAGCUUACAAUCUAGCUGGG
hsa-miR-210-5p	MIMAT0026475	AGCCCCUGCCCACCGCACACUG
hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU
hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266	UCCUUCAUUCACCGGAGUCUG
hsa-miR-184	MIMAT0000454	UGGACGGAGAACUGAUAGGGU
hsa-miR-634	MIMAT0003304	AACCAGCACCCAACUUUGGAC
miRIDIAN Negative Control #1 (cel-miR-67)		CUCUUUCUAGGAGGUUGUGAUU

2.9 Zelllinien

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien und deren Eigenschaften

Name	DSMZ Nummer	Spezies	Ursprung	Wachstumsverhalten	Schutzstufe	Medium
<i>HeLa</i>	ACC 57	Human	Zervix Karzinom	Adherent	BSL 1	DMEM
<i>NB-4</i>	ACC 207	Human	Akute promyeloische Leukämie	Einzelne Zellen in Suspension	BSL 1	RPMI

2.10 Geräte

Gel Doc EZ Imager	Bio-Rad, München
Lichtmikroskop CK2	Olympus, Tokio, Japan
PCR Cycler (T3 Thermocycler)	Biometra, Göttingen
Photometer (BioPhotometer)	Eppendorf, Hamburg
Realtime PCR Cycler (CFX Connect)	Bio-Rad, München
Victor X3 2030 Multilabel Reader	PerkinElmer, Waltham, USA

2.11 Computer Software

A plasmid Editor (ApE)
Bio-Rad CFX Manager 3.1
GraphPad Prism 8.1.0
Inkscape 0.92.3
Mendeley Desktop 1.19.4
Microsoft Office 365

2.12 Datenbanken

Tabelle 6: Verwendete Datenbanken

Datenbank	URL	Version	Referenz	Funktion	letzter Zugriff
miRBase	http://www.mirbase.org/	22.1 (Okt. 2018)	(Kozomara, Birgaoanu & Griffiths-Jones, 2019)	Basisinformationen zu miRNAs	25.03.2020
mirDIP	http://ophid.utoronto.ca/mirDIP	4.1.11.1 (Sep. 2018)	(Tokar <i>et al.</i> , 2018)	Kombiniert verschiedene miRNA-Datenbanken	17.01.2021
RNAhybrid	https://bibiserv.ccbitec.unibielefeld.de/rnahybrid	2.2	(Rehmsmeier <i>et al.</i> , 2004)	Vorhersage mRNA-miRNA-Interaktion	25.03.2020
DIANA microT	http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools	5.0	(Paraskevopoulou <i>et al.</i> , 2013)	Vorhersage mRNA-miRNA-Interaktion	23.12.2019
miRmap	https://mirmap.ezlab.org	1.1	(Vejnar & Zdobnov, 2012)	Vorhersage mRNA-miRNA-Interaktion	25.03.2020
miRmine	http://guanlab.ccm.med.umich.edu/mirmine/index.html		(Panwar, Omenn & Guan, 2017)	miRNA-Expression in Zellen	23.12.2019
miRTarBase	http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/php/index.php		(Huang <i>et al.</i> , 2020)	Experimentell validierte miRNA-Ziele	06.02.2021

3 Methoden

3.1 Datenbankrecherche

Für die Suche nach einer Zelllinie mit geringer miRNA-Expression wurde die miRmine-Datenbank verwendet. Als Kriterium wurde nach einer möglichst geringen Expression der primär zu untersuchenden miRNAs hsa-miR-184, hsa-miR-214-5p und hsa-miR-708 gesucht.

Ziel-UTRs für die Positivkontrollen wurden in der miRTarBase Datenbank recherchiert. Dabei wurden nur Ziele mit starker Evidenz ausgewählt, die durch Reporterassays oder Westernblot validiert waren. Anschließend wurde auf die Original-Veröffentlichungen zurückgegriffen und nur die Ziele ausgewählt, deren Sequenzen in den Publikationen beschrieben und deren Ergebnisse nachvollziehbar waren.

3.2 Quantitative PCR

Um die Ergebnisse der Datenbankrecherchen zur Menge von miRNAs und PR3-mRNA in *HeLa*-Zellen zu überprüfen, wurde die gesamte RNA inklusive miRNAs aus *HeLa*-Zellen gewonnen, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde die *C. elegans* miRNA 39 (cel-miR-39) am Anfang der RNA-Isolation zugefügt (sog. *spike-in* Kontrolle). Untersucht wurden hsa-miR-184, hsa-miR-214-5p und hsa-miR-708, da für diese miRNAs bereits Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bestanden und durch den mirDIP-Algorithmus eine erhöhte Bindungswahrscheinlichkeit an die PR3-mRNA vorhergesagt wurde (siehe Tabelle 22). Außerdem wurde eine PCR zur Quantifizierung der PR3-mRNA in *HeLa*-Zellen durchgeführt. Dabei wurde die universell vorkommende 18S-ribosomale-RNA (18S-rRNA) zur Normierung verwendet.

3.2.1 RNA-Isolation aus *HeLa*-Zellen

Eine zu ca. 60 % konfluente *HeLa*-Zellkultur wurde mit PBS gespült und mit 3 ml Trypsin für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Trypsinierung wurde mit 10 ml antibiotikafreiem DMEM-Medium mit FCS gestoppt und die Zellen bei 200 G zu einem Pellet herunterzentrifugiert. Nach Resuspendieren in 5 ml PBS wurden die Zellen gezählt, 1×10^6 Zellen entnommen und erneut pelletiert. 700 μ l Qiazol wurde zugegeben und für eine Minute geschüttelt. 3,5 μ l der *spike-in*-Kontrolle cel-miR-39 wurden in einer Konzentration von $1,6 \times 10^8$ Kopien/ μ l hinzugefügt und erneut geschüttelt. Anschließend wurde das RNeasy Micro Kit zur Aufreinigung der gesamten RNA entsprechend des Herstellerprotokolls verwendet und mit 20 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde photometrisch bestimmt.

3.2.2 cDNA-Synthese

880 ng der zuvor gewonnenen RNA wurden nun mit Hilfe des miScript II RT Kit entsprechend des Protokolls in cDNA umgeschrieben. Da sowohl mRNA als auch miRNA untersucht werden sollten, wurde der im Kit enthaltene HiFlex-Puffer verwendet. Der Mastermix für die reverse Transkription ist in Tabelle 7 aufgeführt. Die reverse Transkription wurde im Thermocycler für 60 Minuten bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Enzyme bei 95°C für 5 Minuten hitzeinaktiviert.

Tabelle 7: Mastermix für die cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen
5x HiFlex Puffer	4 µl
10x miScript Nucleics Mix	2 µl
RNase-freies Wasser	11 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl
<i>template</i> RNA	1 µl
Total	20 µl

3.2.3 PCR Bedingungen

Zur quantitativen Bestimmung der miRNAs wurde zu 125 µl des Mastermix (Tabelle 8) 10 µl *template* zugegeben. Als *template* wurde entweder Wasser zur Negativkontrolle oder 1:5 verdünnte *HeLa*-cDNA (siehe 3.2.2) verwendet. Die Wells einer 96-Well Platte wurden mit je 13,5 µl dieser Lösung gefüllt und anschließend 10x miScript Primer Assay für die jeweils zu untersuchende miRNA zugegeben. Untersucht wurden hsa-miR-184, hsa-miR-214-5p, hsa-miR-708 und cel-miR-39. Alle Proben wurden doppelt bestimmt und dann der Mittelwert gebildet.

Tabelle 8: Mastermix für die miRNA-qPCR

Reagenz	Volumen
2x QuantiTect SBR Green PCR Mastermix	150 µl
10x miScript Universal Primer	30 µl
RNase-freies Wasser	70 µl

Für die quantitative Bestimmung der mRNA von PR3 in *HeLa*-Zellen wurde zu je 55 µl des Mastermix (Tabelle 9) 5 µl *template* zugegeben. Die *templates* waren entweder RNase-freies Wasser oder *HeLa*-cDNA (siehe 3.2.2) oder bereits im Labor vorhandene cDNA aus *HL60*-Zellen. 12 µl dieser Lösung wurden in je ein Well gegeben und mit 1,5 µl Vorwärtsprimer und 1,5 µl Rückwärtsprimer versehen. Die Primer waren spezifisch für PR3 beziehungsweise für die, zur Normalisierung verwendete 18S-rRNA und bereits im Labor etabliert.

Tabelle 9: Mastermix für die PR3-mRNA-qPCR

Reagenz	Volumen
2x QuantiTect SBR Green PCR Mastermix	120 µl
RNase-freies Wasser	56 µl

Die PCR wurde mit den in Tabelle 10 beschriebenen Bedingungen im Thermocycler durchgeführt. Zur Berechnung der relativen RNA Menge wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Formel (Livak & Schmittgen, 2001) verwendet. Dazu wurden die Mittelwerte der Doppelbestimmung benutzt.

Tabelle 10: Programm der quantitativen PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	15 Min	1
Denaturierung	94 °C	15 s	40
Hybridisierung	55 °C	30 s	40
Elongation	70 °C	30 s	40
Fluoreszenzmessung			40
Denaturierung	95 °C	10 s	1
Schrittweise Fluoreszenzmessung	65 °C – 95 °C		1

3.3 Klonierung

Für die Transfektion von humanen Zellen im Rahmen des Luziferaseassays wurden zunächst Bereiche aus 3'UTRs von verschiedenen Genen in den *pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector* eingefügt. Dazu wurden die Sequenzen mittels PCR vervielfältigt. Durch Restriktionsverdau und anschließende Ligation wurden daraufhin die 3'UTR-Sequenzen hinter der *Firefly*-Luziferase auf dem pmirGLO Vektor eingefügt.

3.3.1 DNA-Extraktion

3×10^6 *NB-4*-Zellen wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrlchen für 5 Minuten bei 200 G und Raumtemperatur zu einem Pellet herunter zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml DNAzol zugegeben und nach Herstellerprotokoll weiter verfahren. Die isolierte DNA wurde in 200 μ l Wasser gelöst und die Reinheit und Konzentration photometrisch bestimmt. Zusätzlich wurde die Größe der Moleküle in einem 1 % Agarosegel überprüft.

3.3.2 Primer-Design

Zur Vervielfältigung und Modifizierung der 3'UTRs wurde die aufgereinigte DNA der *NB-4*-Zellen als *template* verwendet. Die Primer wurden im Programm ApE entworfen und bei einem kommerziellen Anbieter bestellt. Sie bestehen aus der zufälligen Startsequenz ACTG, gefolgt von den Restriktionsschnittstellen für NheI und AvrII für die Vorwärtsprimer bzw. SalI für die Rückwärtsprimer. Anschließend folgen ca. 20 Nukleotide, die zur entsprechenden 3'UTR komplementär bzw. reverskomplementär sind. Es wurde auf ähnliche Hybridisierungstemperaturen für

Vorwärts- und Rückwärtsprimer geachtet und versucht mit G oder C zu enden, um eine optimale Bindung zu erreichen.

3.3.3 PCR-Amplifikation

Um geeigneten Hybridisierungstemperaturen für die Primer zu finden, wurden zunächst die Hybridisierungstemperaturen von 43 – 65°C mit Hilfe einer Gradienten-PCR getestet. Anschließend wurde die PCR bei den herausgefundenen optimalen Temperaturen für die jeweiligen Primer durchgeführt. Die PCR-Ansätze wurden als größerer Mastermix zusammen pipettiert und erst zum Schluss auf 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß verteilt und mit den jeweiligen Primern versehen. Nach erfolgreicher PCR-Amplifikation entstanden somit DNA-Kopien der 3'UTRs, flankiert von den Restriktionsschnittstellen.

Tabelle 11: Reagenzien eines PCR-Ansatzes

Reagenz	Volumen
10x AmpliTaq Puffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Vorwärtsprimer (10 µM)	3 µl
Rückwärtsprimer (10 µM)	3 µl
NB-4-DNA	1 µl
H ₂ O	36,5 µl
AmpliTaq Polymerase	0,5 µl
Total	50 µl

Tabelle 12: Einstellungen der PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	15 s	35
Hybridisierung	43 - 65 °C	30 s	35
Elongation	72 °C	1 Minuten 30 s	35
Finale Elongation	72 °C	7 Minuten	1
Aufbewahrung	4 °C	∞	1

3.3.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Es wurde ein 1 % Agarosegel gegossen und mit 2 µl Gel-Red (10000x) versetzt. 1 µl des PCR-Ansatzes wurde mit 9 µl Wasser und 2 µl Ladepuffer (6x) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Nach einer Stunde bei 70 V wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und die Banden mit einem mitgelaufenen 100bp-DNA-Größenmarker verglichen. Wenn die Bande auf Höhe der erwarteten Bandengröße vorhanden war, wurde der restliche PCR-Ansatz mit dem Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up Kit aufgereinigt und in 50 µl H₂O eluiert.

3.3.5 Restriktionsverdau

5,7 μ l 10x Cutsmart Puffer wurden zu 50 μ l aufgereinigtem PCR-Produkt gegeben und mit je 1 μ l der Restriktionsenzyme NheI und SalI für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Restriktionsverdau resultiert in doppelsträngiger DNA mit zwei unterschiedlichen klebrigen Enden. Im Folgenden werden diese DNA-Stücke *inserts* genannt. Parallel zum Verdau der *inserts*, wurde auch der pmirGlo Vektor mit NheI und SalI verdaut. Um einen vollständigen Verdau des Vektors zu gewährleisten wurde dieser für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Dies führt zu einer Öffnung und Linearisierung des Plasmids in der *multiple cloning site*.

3.3.6 Ligation

Nach dem Verdau wurden sowohl Vektor als auch die *inserts* erneut auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und die entsprechenden Banden ausgeschnitten. Die erhaltenen Gelstücke wurden mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit aufgereinigt und erneut in 50 μ l H₂O eluiert. Anschließend wurden Vektor und *insert* mittels T4-DNA-Ligase wieder zu einem Plasmid zusammengefügt. Der Ligationsansatz beinhaltete 1 μ l Vektor, 8 μ l *insert*, 10 μ l T4-DNA-Ligasepuffer (2x) und 1 μ l T4-DNA-Ligase. Dieser Ansatz wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

3.3.7 Transformation

50 μ l kompetente 5-alpha *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und 5 μ l des Ligationsansatzes wurden zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 30 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C im Wasserbad ausgesetzt und anschließend wieder für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde 250 μ l S.O.C-Medium zugegeben und für 45 Minuten bei 37°C im Schüttler inkubiert. Dann wurden 20 μ l der Bakterienlösung auf einer 10 cm Agarplatte mittels Drei-Ösen-Ausstrich aufgetragen. Zur Selektion auf erfolgreich transformierte *E. coli* enthielt der Agar 100 mg/l Ampicillin. Nach dem Ausstrich wurden die Platten für 12 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.3.8 Identifizierung von Bakterienkolonien mit korrektem Plasmid

Um *E. coli* Kolonien zu finden, die das konstruierte Plasmid während der Transformation erhalten hatten, wurden einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. Die am Gefäß haftenden Bakterien bzw. ihre DNA dienten dann als *template* für eine *colony-screening*-PCR. Dazu wurden 11 μ l des in Tabelle 13 beschriebenen Mastermixes kontaktlos in das Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend eine PCR durchgeführt (Tabelle 14). Die dafür verwendeten Primer binden kurz vor und hinter der *multiple cloning site* auf dem pmirGLO Vektor. Anschließend wurde die Größe der entstandenen PCR-Produkte durch Auftragen auf ein 1 % Agarosegel überprüft. Kolonien, die ein PCR-Produkt der erwarteten Größe

aufwiesen, wurden erneut mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen und in 2 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Tabelle 13: Mastermix für die *Colony-Screening-PCR*

Reagenz	Volumen
10x AmpliTaq Puffer	40 µl
dNTPs (10 mM)	8 µl
Vorwärtsprimer (10 µM)	24 µl
Rückwärtsprimer (10 µM)	24 µl
H ₂ O	300 µl
AmpliTaq Polymerase	4 µl
Total	400 µl

Tabelle 14: Einstellungen der *Colony-Screening-PCR*

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	15 s	37
Hybridisierung	56 °C	30 s	37
Elongation	72 °C	1 Minuten 30 s	37
Finale Elongation	72 °C	5 Minuten	1
Aufbewahrung	4 °C	∞	1

3.3.9 Miniprep, Testverdau und Sequenzierung

Für die anschließende Plasmidproduktion wurden ca. 100 µl Bakterienkultur aufbewahrt. Der Rest wurde mit dem Kit NucleoSpin Plamid weiterverarbeitet. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in 50 µl H₂O eluiert. Zur zusätzlichen Überprüfung der Plasmide, wurden 10 µl dieses Eluates mit dem Restriktionsenzym AvrII für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Proben, die dem erwarteten Bandenmuster entsprachen, wurden zur Sequenzierung an Eurofins Genomics geschickt. Die Sequenzierung fand für jede Probe sowohl in 5‘-, als auch in 3‘-Richtung statt und wurde mit den Primern aus Tabelle 3 durchgeführt.

3.3.10 Plasmidproduktion

Klone mit korrektem Sequenzierungsergebnis wurden über Nacht bei 37°C im Schüttler vermehrt. Dazu wurden die aufbewahrten Bakterienkulturen aus Kapittel 3.3.9 zu 100 ml LB-Amp gegeben. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit nach Herstelleranleitung. Es wurde in 200 µl H₂O eluiert. Die DNA-Ausbeute wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photospektrometrisch

bestimmt. Für die weitere Transfektion wurden alle Proben auf eine Konzentration von 200 ng/ μ l eingestellt.

3.4 Transfektion von *HeLa*-Zellen

Prinzipiell wurden die Proben und die dazugehörigen *no-target*-Kontrollen (NTC) immer zeitgleich bearbeitet und die gleichen Reaktionsansätze verwendet um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Für jede Transfektion wurden technische Triplikate untersucht und wenn nicht anders angegeben wurde jeder Versuch an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt (biologische Triplikate).

3.4.1 Vorbereiten der *HeLa*-Zellen

HeLa-Zellen wurden nach dem Auftauen mindestens zweimal passagiert und bei einer Konfluenz von 60 – 90 % für die Versuche verwendet. Alle verwendeten Zellen wurden weniger als 10-mal passagiert und ihre Vitalität wurde vor jedem Versuchsdurchgang im Auflichtmikroskop kontrolliert. Für die Transfektion wurde eine T75-Flasche mit *HeLa*-Zellen zunächst mit 10 ml PBS gespült und anschließend mit 3 ml Trypsin für 5 Minuten bei 37°C vom Flaschenboden gelöst. Zum Stoppen der Trypsinierung wurden 12 ml DEMEM mit 10 % FCS ohne Antibiotika zugegeben und die Zellen in einer Zählkammer gezählt. Mit dem gleichen Medium wurde anschließend die Zellsuspension auf eine Konzentration von 50000 Zellen/ml verdünnt und je 100 μ l pro Well in eine 96-Well Platte pipettiert. Damit die *HeLa*-Zellen anwachsen können wurde die Platte für 24 Stunden bei 37°C weiter inkubiert.

3.4.2 Erstellen des Transfektionsansatzes

Der Transfektionsmix bestand aus je einem der zuvor produzierten Plasmide (siehe 3.1) und einer künstlichen reifen miRNA (miRNA-mimic) aus Tabelle 4. Mit Hilfe eines lipidbasierten Transfektionsreagens kann diese fremde DNA und RNA in die Zellen eindringen und dort wie zelleigene Nukleinsäuren wirken. Dazu wurde zunächst eine 0,2 μ M Arbeitslösung der miRNA-*mimics* in Optimem Medium sowie eine Plasmid-Arbeitslösung von 20 μ g/ml in Wasser hergestellt. Parallel wurde das Transfektionsreagenz DharmaFECT Duo 1:50 in Optimem Medium verdünnt und für 5 Minuten inkubiert. Zu 17,5 μ l Plasmid-Arbeitslösung wurde 17,5 μ l miRNA-*mimic* Arbeitslösung gegeben und nach der Zugabe von 35 μ l verdünntem Transfektionsreagenz wurde der Ansatz für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Erstellen des fertigen Transfektionsmixes wurde 280 μ l DMEM mit 10 % FCS ohne Antibiotika zu den Ansätzen pipettiert. 100 μ l des Transfektionsmixes wurden schließlich auf jedes abgesaugte Well der 96-Well Platte gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Mit einem Transfektionsmix konnten somit 3 Wells mit *HeLa*-Zellen transfiziert werden, es handelt sich dabei um technische Triplikate. Die Endkonzentration der miRNAs in den Wells lag somit bei 10 nM, die Konzentration der Plasmide bei 1 μ g/ml.

3.4.3 Luziferasreaktion

Beim dualen Luziferase-Reporterassay wird zunächst die Enzymaktivität der *Firefly*-Luziferase gemessen. Nach dem Stoppen der Reaktion folgt die Messung der *Renilla*-Luziferaseaktivität. Dazu wurde das Medium der *HeLa*-Zellen aus 3.4.2 zunächst durch je 50 µl PBS ersetzt. Die Reagenzien des *Dual-Glo Luciferase Assay* Systems wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und 50 µl Dual-Glo Reagenz in jedes Well gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte in ein Luminometer gestellt, für 1 Sekunde geschüttelt und dann die Lumineszenz aller Wells gemessen. Anschließend wurde die Reaktion der *Firefly*-Luziferase durch die Zugabe von 50 µl Stop-Glo Reagenz angehalten und nach weiteren 10 Minuten Inkubation auf gleiche Weise die *Renilla*-Aktivität gemessen.

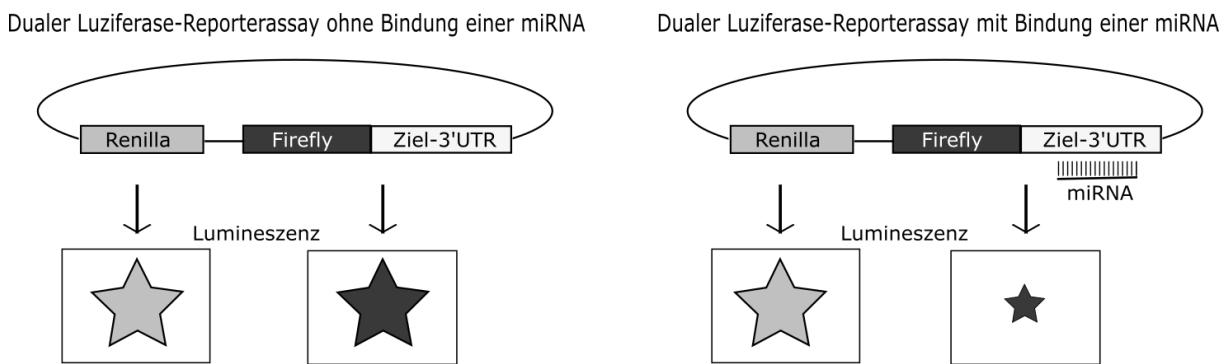


Abbildung 9: Funktionsprinzip des dualen Luziferase-Reporterassays.

Zunächst leuchtet die *Firefly*-Luziferase, nach Abstoppen der Reaktion folgt die Messung der *Renilla*-Luziferaseaktivität. Bindet eine miRNA an die Ziel-3'UTR, so wird die damit gekoppelte *Firefly*-Luziferase weniger exprimiert und die Lumineszenz ist im Verhältnis zur *Renilla*-Lumineszenz verringert.

3.5 Datenauswertung

Es wurde am Institut für Medizinische Biometrie und Statistik eine biometrische Beratung im Umfang von zwei Stunden in Anspruch genommen.

Aus den erhaltenen Lichtintensitäten (RLU) eines Wells für die *Firefly*-Luziferasreaktion und der *Renilla*-Luziferasreaktion wurde die *F/R*-Ratio gebildet. Dieser Quotient wurde für alle Wells eines Versuchstages gebildet. Dann wurde der Mittelwert der technischen Triplikate ermittelt. Eindeutige Ausreißer wurden entfernt, dies war bei allen Versuchen insgesamt vier Mal der Fall. Dann wurde der berechnete Mittelwert durch den Mittelwert der Negativkontrolle (cel-miR-67) geteilt. Diese *C. elegans*-miRNA hat keine Bindungsstellen im humanen Transkriptom und dient daher als Normierung um unspezifische Effekte der Transfektion mit synthetischer RNA herauszurechnen. Die Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, drei Mal an verschiedenen Tagen durchgeführt und

der Mittelwert dieser biologischen Triplikate in den Ergebnissen dargestellt. Identisch wurde mit den Daten der *no-target*-Kontrolle (NTC) verfahren, die in den Ergebnissen ebenfalls dargestellt sind.

Unterschiede zwischen den Ergebnissen der NTC und des jeweils betrachteten Plasmids wurden mittels t-Test statistisch getestet. Alle p-Werte sind im Anhang zu finden (Tabelle 25, Tabelle 26). Streng genommen ist bei einer Anzahl von drei Werten ($n = 3$) die Annahme einer Normalverteilung nicht überprüfbar und somit kein t-Test anwendbar. Um die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch mit publizierten Arbeiten zu vergleichen, wurde hier auf den üblicherweise verwendeten t-Test zurückgegriffen. Da alle Wells eines Versuchstages die gleichen Zellen beinhalteten und die Wells identisch und zeitlich parallel behandelt wurden, wurde für alle Ergebnisse eines Versuchs die gleiche Standardabweichung angenommen.

Da für alle 22 untersuchten miRNAs jeweils ein t-Test durchgeführt wurde, ist es bei Ablehnung der Nullhypothese mit $p < 0,05$ sehr wahrscheinlich allein durch häufiges Testen ein fälschlicherweise als signifikant eingestuftes Ergebnis zu erhalten. Eine Möglichkeit, diesen Fehler zu verhindern bieten Korrekturen auf multiples Testen wie die Methode nach Holm-Sidak. Da im Rahmen der Literaturrecherche in keinem der gefundenen Artikel auf multiples Testen korrigiert wurde, wurde dies auch hier zur besseren Vergleichbarkeit nicht durchgeführt. Es sei daher darauf hingewiesen, dass die hier als signifikant klassifizierten miRNAs weitere Prüfung benötigen (siehe Kapitel 5.4). Bei Anwendung der Korrektur nach Holm-Sidak ist das Ergebnis für hsa-let-7f in Abbildung 11 nicht mehr signifikant. Alle weiteren Ergebnisse ändern sich hingegen nicht.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung des Assays

4.1.1 Auswahl einer Zelllinie

HeLa-Zellen wurden bewusst gewählt, da sie als Standardzellkultur gelten und relativ wenige miRNAs exprimieren. Um jedoch die weiteren Ergebnisse besser einschätzen zu können, wurde eine Recherche zur endogenen Expression der verwendeten miRNAs in der miRmine-Datenbank durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt. Keine der primär zu untersuchenden miRNAs (hsa-miR-184, hsa-miR-214-5p, hsa-miR-708) wird in *HeLa*-Zellen exprimiert. Um die Recherche experimentell zu überprüfen, wurde eine qPCR mit Primern für hsa-miR-214-5p, hsa-miR-708 und hsa-miR-184 durchgeführt. Auch mit dieser Methode konnte keine der miRNAs in *HeLa*-Zellen gefunden werden (Tabelle 16). Die *spike-in*-Kontrolle cel-miR-39 wurde hingegen vervielfältigt und zeigt somit, dass die Aufreinigung und PCR prinzipiell funktioniert hat. Die Fluoreszenzintensität übersteigt den im PCR-Cycler voreingestellten Schwellenwert (C_T) mit *HeLa*-cDNA als *template* nach 25,2 PCR-Zyklen (Tabelle 16). Die *no-template*-Kontrollen (NTC) waren hingegen frei von DNA.

Laut Pieters *et al.*, 2004 wird in *HeLa*-Zellen auch keine PR3-mRNA exprimiert. Da eine endogene Expression negative Auswirkungen auf den Luziferaseassay haben könnte, wurde dies ebenfalls mittels qPCR überprüft. Die Berechnung der relativen Expression der PR3-mRNA ergab eine Expression von $3,8 \times 10^{-4}$ bezogen auf *HL60*-Zellen (Tabelle 17). Dies bedeutet, dass *HL60* Zellen ca. 2600-mal mehr PR3-mRNA bilden als *HeLa*-Zellen. Da auch in der *no-template*-Kontrolle geringe Mengen PR3-mRNA gefunden wurde (Tabelle 24), ist davon auszugehen, dass es sich hierbei eher um Artefakte handelt und die tatsächliche Menge an PR3-mRNA in *HeLa*-Zellen noch geringer ist. *HeLa*-Zellen eignen sich somit als PR3-arme Zellen für die weiteren Versuche.

Tabelle 15: Expression der untersuchten miRNAs in *HeLa*-S3-Zellen.

Daten entnommen aus der miRmine-Datenbank am 23.12.2019.

Name der miRNA	Expression (log2 der reads per million)
hsa-miR-122-5p	0
hsa-miR-1271-5p	0
hsa-miR-214-5p	0
hsa-miR-148a-5p	0
hsa-miR-335-5p	4,0
hsa-miR-375	2,5
hsa-miR-193b-5p	3,7
hsa-miR-26b-5p	9,8

hsa-miR-140-5p	2,8
hsa-miR-1228-3p	0
hsa-miR-532-3p	2,8
hsa-miR-572	0
hsa-miR-1825	0
hsa-miR-30b-5p	7,1
hsa-miR-29b-2-5p	0
hsa-let-7f-5p	14,6
hsa-miR-10b-5p	7,1
hsa-miR-708-5p	0
hsa-miR-210-5p	2,4
hsa-miR-31-5p	10,1
hsa-miR-205-5p	0
hsa-miR-184	0
hsa-miR-634	0

Tabelle 16: Ergebnisse der miRNA-qPCR.

Die Menge der miRNAs-184, 214-5p und 708 in *HeLa*-Zellen wurde mittels qPCR bestimmt. Als Positivkontrolle diente die *spike-in* miRNA cel-miR-39.

miRNA	C _T - Wert	
	H ₂ O-template (NTC)	HeLa-cDNA-template
cel-miR-39	nicht messbar	25,2
hsa-miR-184	nicht messbar	nicht messbar
hsa-miR-214-5p	nicht messbar	nicht messbar
hsa-miR-708	nicht messbar	nicht messbar

Tabelle 17: Mittels qPCR bestimmte relative Expression der PR3-mRNA in *HeLa*-Zellen.

Zur Berechnung wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Formel (Livak & Schmittgen, 2001) verwendet. Die Rohdaten sind im Anhang in Tabelle 24 zu finden.

Zelllinie	relative Expression
HL60	1
HeLa	$3,8 \times 10^{-4}$

4.1.2 Auswahl einer Positivkontrolle

Zur Etablierung des dualen Luziferaseassays wurde zunächst nach möglichen Positivkontrollen, bestehend aus miRNA und einer experimentell gesicherten Ziel-3'UTR gesucht. Da die humane miRNA hsa-miR-122 aufgrund ihrer Bedeutung bei Hepatitis C bereits gut erforscht ist, bot sie sich zur Etablierung des Assays an. In der Datenbank miRTarBase wurden die experimentell validierten 3'UTRs von „Aldolase A“ (ALDOA) und „Forkhead box protein P1“ (FOXP1) (Tsai *et al.*, 2009),

sowie ADAM17, ein für die ANCA assoziierte Vaskulitis interessantes Ziel (siehe 1.2.4) von hsa-miR-122 ausgewählt. Auf gleiche Weise wurde nach validierten Ziel-mRNAs der zu untersuchenden miRNAs gesucht und für hsa-miR-708 die 3'UTR von „Neuronatin“ (NNAT) (Ryu *et al.*, 2013) sowie für hsa-miR-184 die 3'UTR von „RAC-beta serine/threonine-protein kinase“ (AKT2) (Foley *et al.*, 2010) ausgewählt.

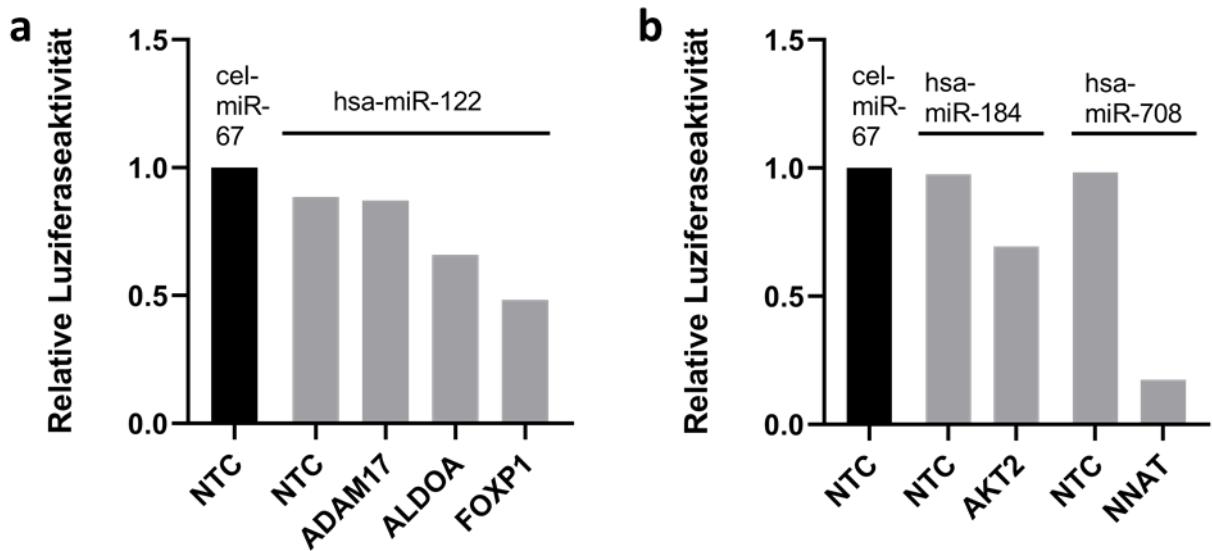


Abbildung 10: Luciferaseassay zur Evaluation von Positivkontrollen

Darstellung der Luciferaseaktivitäten nach Cotransfektion von verschiedenen miRNA-*mimics* zusammen mit den dazugehörigen bekannten Ziel-3'UTRs im pmirGLO Vektor. Als Normierung diente cel-miR-67 *mimic*, die in humanen Zellen keine bekannten Ziel-mRNAs hat und keine spezifische Wirkung aufweist. Als Negativkontrolle wurde das jeweilige miRNA-*mimic* mit pmirGLO ohne klonierte 3'UTR (NTC) verwendet. Angegeben ist der Mittelwert technischer Triplikate eines Versuchs (n = 1) a) Darstellung der Luciferaseaktivität nach Transfektion von hsa-miR-122-*mimic* zusammen mit den bekannten Ziel-3'UTRs ADAM17, ALDOA und FOXP1 b) Luciferaseaktivität nach Transfektion von hsa-miR-184-*mimic* mit der bekannten Ziel-3'UTR von AKT2, sowie hsa-miR-708-*mimic* mit der 3'UTR von NNAT.

Tabelle 18: Effektstärke möglicher Positivkontrollen des Luciferaseassays

3'UTR	miRNA-mimic	Änderung der relativen Luciferaseaktivität verglichen mit NTC
ADAM17	Hsa-miR-122	-1,5 %
ALDOA	Hsa-miR-122	-25,5 %
FOXP1	Hsa-miR-122	-45,4 %
AKT2	Hsa-miR-184	-28,8 %
NNAT	Hsa-miR-708	-82,2 %

Wie in Abbildung 10 und Tabelle 18 dargestellt ist, zeigen alle der gewählten Kandidaten außer ADAM17 in Kombination mit dem dazugehörigen miRNA-*mimic* einen Effekt. Die stärkste Senkung der Luciferaseaktivität von 82,2 % weist dabei NNAT in Kombination mit hsa-miR-708 auf. Da es sich bei solch starken Wirkungen jedoch eher um siRNA-vermittelte Prozesse handelt, wurde für die

weitere Optimierung des Systems FOXP1 mit hsa-miR-122 verwendet. Um verlässliche Ergebnisse mit möglichst geringen unspezifischen Effekten zu erreichen wurden verschiedene Konzentrationen von miRNA-*mimics* getestet. Die besten Ergebnisse wurden dabei mit 10 nM miRNA-*mimic* erzielt (Abbildung 14).

Für die Versuche zur Darstellung von Effekten von miRNA-*mimics* auf die PR3-3'UTR wurde als Positivkontrolle AKT2 gewählt. Zum einen lag die Effektstärke mit ca. 30 % im Rahmen der erwarteten Effekte auf die PR3-mRNA. Zum anderen wird AKT2 von hsa-miR-184 reguliert, welche in der GPA-Nasenschleimhaut am stärksten überexprimiert wird (Schinke *et al.*, 2013). Da hsa-miR-184-*mimic* somit in jedem weiteren Versuch verwendet wurde, gestaltete sich die Handhabung dieser Positivkontrolle einfacher.

4.2 Effekte der miRNA-*mimics* auf die PR3-3'UTR

Nach der Klonierung der 3'UTR von Proteinase 3 in den pmirGLO Vektor wurde das Plasmid jeweils mit dem miRNA-*mimic* einer der 21 bei GPA veränderten miRNAs in *HeLa*-Zellen cotransfiziert. Nach 24 Stunden wurde die Luziferaseaktivität durch Messung der Lumineszenz bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Luziferaseaktivität relativ zur Negativkontrolle cel-miR-67 dargestellt. Als *no-target*-Kontrolle (NTC) für die 3'UTR diente der leere pmirGLO Vektor. Die Positivkontrolle bestehend aus der 3'UTR von AKT2 cotransfiziert mit hsa-miR-184 zeigte mit einer Reduktion der Luziferaseaktivität von durchschnittlich 29,3 % (n = 6), dass der Assay prinzipiell in der Lage ist den Effekt von miRNAs darzustellen (Abbildung 11a, Tabelle 19) und lag im gleichen Größenbereich wie bei den vorangegangenen Versuchen (siehe Tabelle 18). Für 19 der 21 miRNA-*mimics* konnte keine signifikante Änderung der Luziferaseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle NTC festgestellt werden (Abbildung 11c und e). Anders verhielten sich die beiden miRNA-*mimics* hsa-let-7f und hsa-miR-184. Sie zeigten eine signifikante Reduktion der relativen Luziferaseaktivität von 12,3 % (n = 3) für hsa-let-7f sowie 17,5 % (n = 6) für hsa-miR-184 (Abbildung 11b und d, Tabelle 19).

Die miRNA hsa-miR-634 wurde zusätzlich zu den von Schinke *et al.* gefundenen miRNAs getestet, da berichtet wurde, dass sie eine Rolle bei ANCA-assozierter Vaskulitis spielt und im Serum von GPA-Patienten erhöht exprimiert wird (Bertram *et al.*, 2015). Es konnte mit dem hier verwendeten Luziferaseassay keine signifikante Änderung der Luziferaseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden (Abbildung 11e, Tabelle 19).

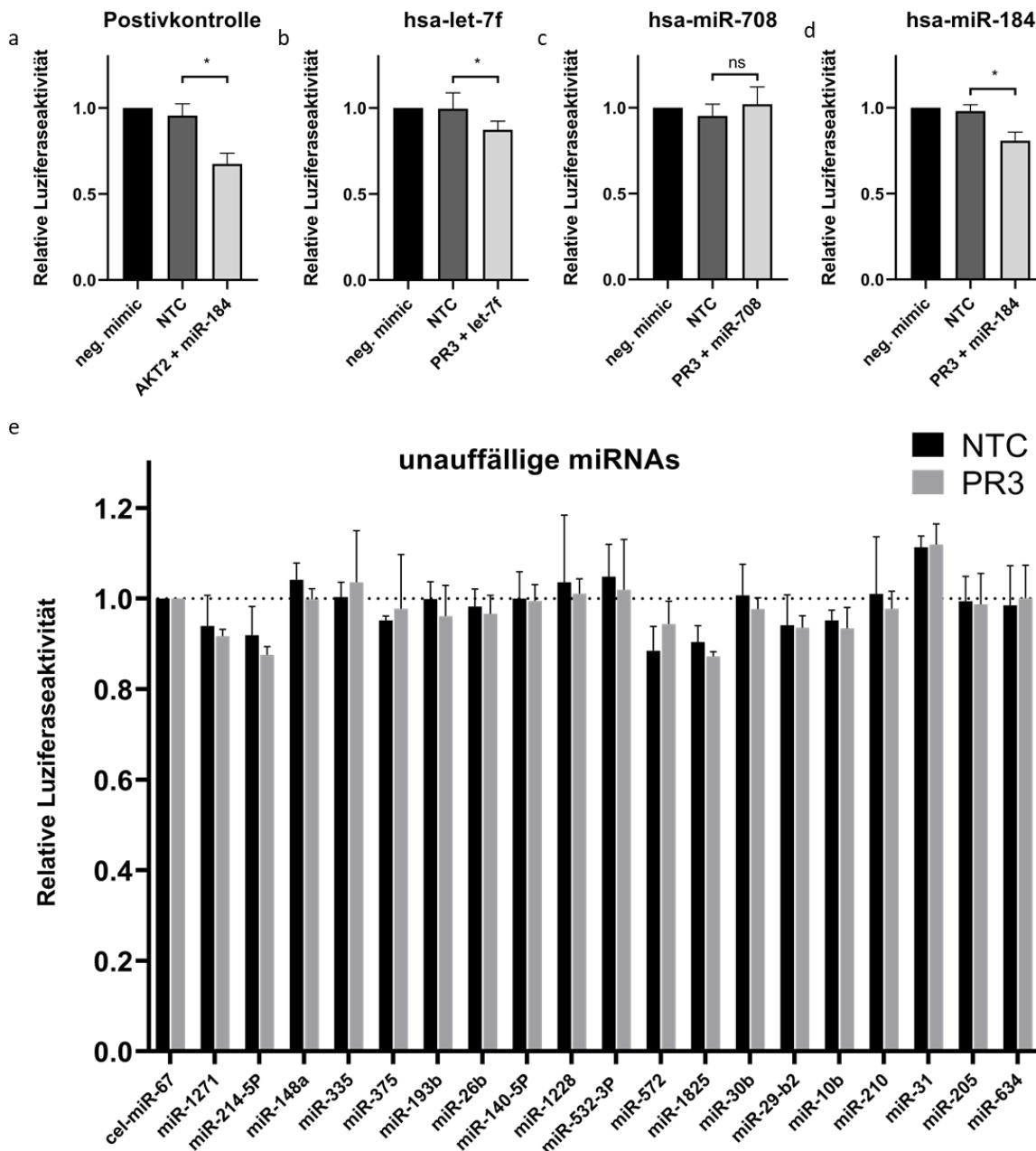


Abbildung 11: Luciferaseassay zur Darstellung der miRNA-*mimic* Wirkung auf die 3'UTR von Proteinase 3. Luciferaseaktivitäten nach Cotransfektion von verschiedenen miRNA-*mimics* mit der 3'UTR von Proteinase 3 im pmirGLO Vektor. Als Normierung diente cel-miR-67-*mimic* (neg. mimics), die in humanen Zellen keine bekannten Ziel-mRNAs hat und keine spezifische Wirkung aufweist. Verglichen wurde jeweils die relative Luciferaseaktivität einer no-target-Kontrolle (NTC) mit der relativen Luciferaseaktivität des Reporters mit der PR3-3'UTR. Als NTC diente der leere pmirGLO Vektor. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen ($n = 3$) mit jeweils 3 technischen Replikaten, wenn nicht anders angegeben. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant. **a)** Cotransfektion von AKT2-3'UTR mit hsa-miR-184 als Positivkontrolle des Versuchsaufbaus ($n = 6$). **b,c,d)** Darstellung der relativen Luciferaseaktivität nach Cotransfektion der PR3-3'UTR mit den miRNA-*mimics* bei denen in diesem oder den weiteren Versuchen ein Effekt messbar war (siehe auch Abbildung 12). Bei Hsa-miR-184 ist das Ergebnis von 6 unabhängigen Versuchen dargestellt ($n = 6$). **e)** Darstellung aller weiteren untersuchten miRNAs bei denen jedoch kein signifikanter Unterschied zur NTC messbar war.

Tabelle 19: Effektstärke ausgewählter miRNA-*mimics* auf die 3'UTR von Proteinase 3

3'UTR	miRNA- <i>mimic</i>	Änderung der relativen Luziferaseaktivität verglichen mit NTC	Signifikanzwert p
AKT2 (Positivkontrolle)	Hsa-miR-184	-29,3 %	0,000012
PR3	Hsa-let-7f	-12,3 %	0,015820
PR3	Hsa-miR-708	7,2 %	0,174598
PR3	Hsa-miR-184	-17,5 %	0,000010
PR3	Hsa-miR-634	1,6%	0,753549

4.3 Effekte der miRNA-*mimics* auf die alternative PR3-3'UTR

Zur Untersuchung von möglicherweise veränderten miRNA-Wirkungen bei der von McInnis *et al.*, 2015 beschriebenen alternativen 3'UTR der Proteinase 3, wurde eine um 132 Basen längere 3'UTR Sequenz kloniert. Durch alternative Polyadenylierung entsteht dadurch eine Proteinase 3 mRNA, die eine um 80 Basen verlängerte 3'UTR enthält. Das Plasmid mit der alternativen PR3-3'UTR wurde, wie bereits in 4.2 beschrieben, mit 21 miRNA-*mimics* in *HeLa*-Zellen transfiziert und die Lumineszenz ausgewertet. Die Positivkontrolle zeigte wie in den vorangegangenen Versuchen eine ausgeprägte Inhibition der Luziferaseaktivität mit einer Reduktion von 30,6 % (n = 3) (Abbildung 12a, Tabelle 20). Die Ergebnisse der 18 miRNAs aus Abbildung 12e entsprechen den Ergebnissen der kanonischen PR3-3'UTR (Abbildung 11e). Sie zeigten weder eine signifikante Wirkung auf die kanonische, noch die alternative 3'UTR von PR3. Anders war das Ergebnis für die in Abbildung 12 b - d dargestellten miRNAs. Hsa-let-7f zeigte mit einer Reduktion von 29,2 % (n = 3) einen deutlich stärkeren Effekt auf die alternative 3'UTR (12,3 % bei der kanonischen PR3-3'UTR). Starke Abweichungen im Vergleich zur kanonischen PR3-3'UTR zeigten sich jedoch vor allem für die beiden miRNAs hsa-miR-708 und hsa-miR-184. Hsa-miR-708 hatte keinen Effekt auf die kanonische PR3-3'UTR, auf die alternative 3'UTR wirkt sich das miRNA-*mimic* jedoch mit einer signifikanten Reduktion der Luziferaseaktivität von 23,6 % aus. Umgekehrt verhielt sich das Ergebnis der miRNA 184. Hsa-miR-184-*mimic* hatte auf die alternative 3'UTR im Gegensatz zur kanonischen 3'UTR keinen signifikanten Effekt (Abbildung 12 b - d, Tabelle 20).

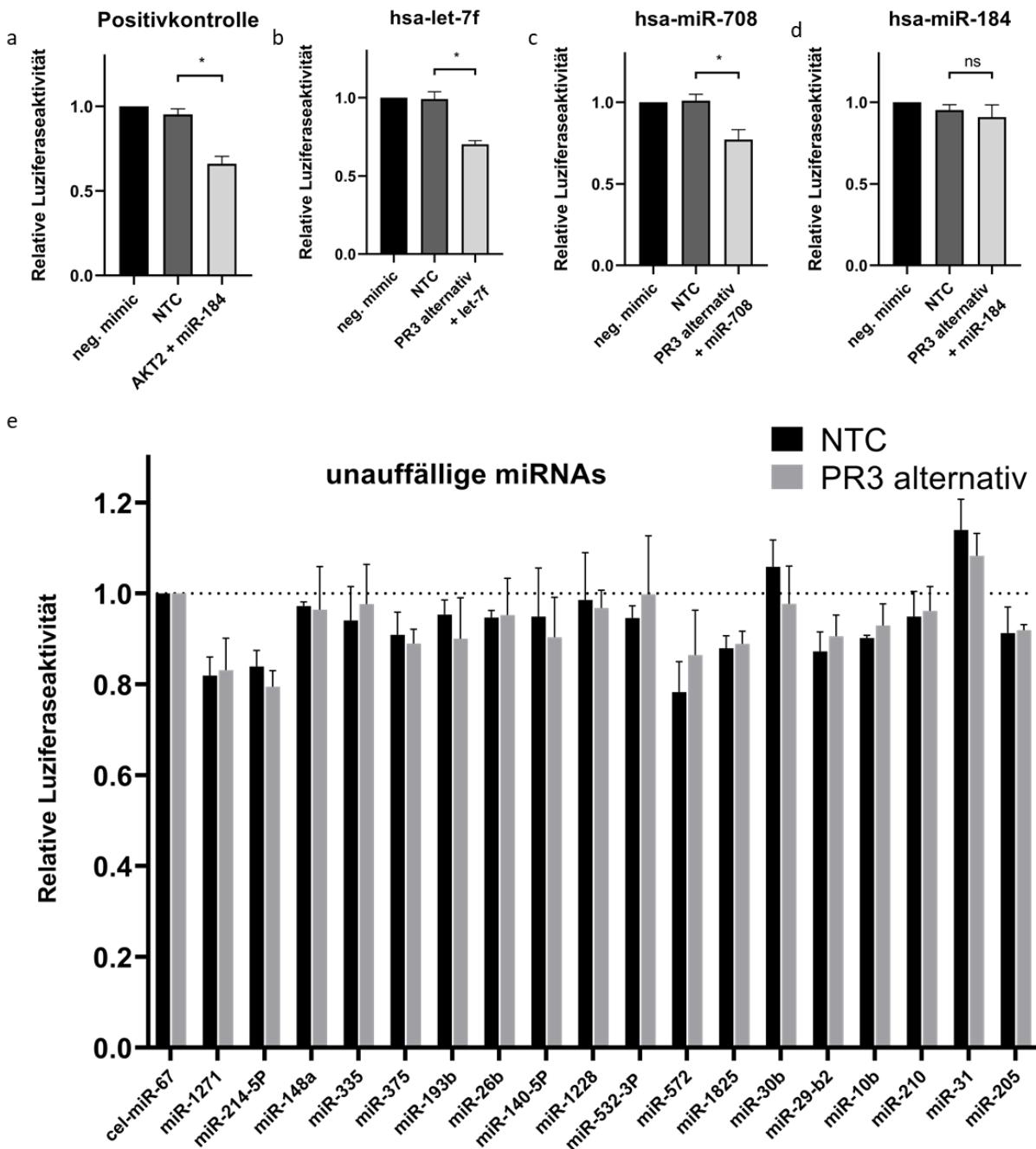


Abbildung 12: Luziferaseassay zur Darstellung der miRNA-*mimic* Wirkung auf die alternative 3'UTR von Proteinase 3. Luziferaseaktivitäten nach Cotransfektion von verschiedenen miRNA-*mimics* mit der alternativen 3'UTR von Proteinase 3 im pmirGLO Vektor. Als Normierung diente cel-miR-67-*mimic*, das in humanen Zellen keine bekannten Ziel-mRNAs hat und keine spezifische Wirkung aufweist (neg. *mimic*). Als Negativkontrolle wurde das jeweilige miRNA-*mimic* mit pmirGLO ohne klonierte 3'UTR (NTC) verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen ($n = 3$) mit jeweils 3 technischen Replikaten. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant **a)** Cotransfektion von AKT2-3'UTR mit hsa-miR-184 als Positivkontrolle des Versuchsaufbaus. **b,c,d)** Darstellung der relativen Luziferaseaktivität nach Cotransfektion der alternativen PR3-3'UTR mit den miRNA-*mimics* bei denen ein signifikanter Effekt messbar war. Hsa-miR-184 wurde hier ebenfalls gezeigt, da diese miRNA bei vorausgegangenen Versuchen relevant war (siehe Abbildung 11). **e)** Darstellung aller weiteren untersuchten miRNAs bei denen jedoch kein signifikanter Unterschied zur NTC messbar war.

Tabelle 20: Effektstärke ausgewählter miRNA-*mimics* auf die alternative 3'UTR von Proteinase 3

3'UTR	miRNA- mimic	Änderung der relativen Luziferaseaktivität verglichen mit NTC	Signifikanzwert p
AKT2 (Positivkontrolle)	Hsa-miR-184	-30,6 %	<0,000001
PR3 alternativ	Hsa-let-7f	-29,2 %	<0,000001
PR3 alternativ	Hsa-miR-708	-23,6 %	0,000002
PR3 alternativ	Hsa-miR-184	-4,5 %	0,359213

5 Diskussion

Die Pathophysiologie der Entstehung von ANCA-assozierter Vaskulitiden wie der GPA ist bis heute unklar. Eine Ursache der Krankheitsentstehung und der Aufrechterhaltung der Vaskulitisaktivität ist die vermehrte Expression des Autoantigens PR3 in bestimmten Populationen neutrophiler Granulozyten (Yang *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2020). Zu dieser Überexpression von PR3 tragen epigenetische Modifikationen wie ein verändertes DNA-Methylierungsmuster bei (Ciavatta *et al.*, 2010). Ein weiterer, bei anderen Erkrankungen gut untersuchter Regulationsmechanismus der Genexpression, ist die Inhibition durch miRNAs. Die Wirkung von miRNAs auf die PR3 wurde bisher jedoch nicht untersucht. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ergaben eine Auswahl von 21 miRNAs, die an der Pathogenese der GPA beteiligt sein könnten. In dieser Arbeit wurde nun der direkte Effekt von drei miRNAs auf die PR3 mittels dualem Luziferase-Reporterassay nachgewiesen, wofür zunächst ein funktionierendes System etabliert wurde.

5.1 Etablierung des Assays

Das Problem älterer Luziferaseassays, die bei schwankender Transfektionseffizienz häufig zu falschen Ergebnissen führten, wurde in diesem Assay durch den Einsatz eines einzelnen Plasmids mit zwei verschiedenen Luziferasegenen (dualer Luziferaseassay) vermieden. Die *Renilla*-Luziferase dient dabei als Normierung. Gleichzeitig kann sie zur Überprüfung der Transfektionseffizienz genutzt werden. Im Gegensatz zur *Firefly*-Luziferase, wird sie von den miRNA-*mimics* nicht reguliert. Dieser Normierungsschritt sorgt für zuverlässig replizierbare Ergebnisse.

Problematisch könnte die Verwendung von miRNA-*mimics* sein. Es handelt sich dabei um synthetisch hergestellte doppelsträngige RNAs, die transient transfiziert werden und die Funktion reifer miRNAs übernehmen sollen. Für mehr Stabilität und bessere Wirkung sind sie in der Regel chemisch modifiziert. Die genaue Zusammensetzung der miRNA-*mimics* wird dabei von den Herstellern nicht an die Nutzer weitergegeben und ist somit unbekannt. Zwar werden miRNA-*mimics* in fast allen Forschungsarbeiten zu miRNAs verwendet, die genaue Wirkweise bleibt jedoch unklar und unspezifische Effekte sind nicht ausgeschlossen (Jin *et al.*, 2015). Um solche unspezifischen Effekte gering zu halten, wurde in dieser Studie anstelle der häufig verwendeten Konzentration von 100 nM (Selbach *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2013; Gwiggner *et al.*, 2018) mit einer Endkonzentration von 10 nM gearbeitet. Trotz der niedrigen Konzentration blieb der Effekt der *mimics* gleich stark (Abbildung 14). Eine weitere Verdünnung wurde nicht getestet, da keine Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Transfektion mit cel-miR-67 zu reinem Medium (MOC) erkennbar waren. Eine Alternative zur Verwendung von miRNA-*mimics* ist die Herstellung von Zelllinien mit stabiler Überexpression der endogenen miRNA. Dabei handelt es sich jedoch um virale Vektorsysteme, die eine höhere Sicherheitsstufe erfordern. Außerdem wäre ein solches System für die hier untersuchte Anzahl von 22 verschiedenen miRNAs aus zeitlichen Gründen nicht praktikabel gewesen.

5.1.1 Auswahl der Zelllinie

MiRNAs üben kleine Effekte auf viele Ziel-UTRs aus und viele miRNAs regulieren dasselbe Ziel. Die Darstellung geringer Effekte in Primärzellen ist schwierig, daher wird meistens auf Reportersysteme zurückgegriffen. Der Vorteil der Reportersysteme ist, dass viele unbekannte Faktoren eliminiert werden können. Dies bringt jedoch auch Nachteile mit sich. So kann es sein, dass im Reporterassay gemessene Effekte im biologischen System durch andere Vorgänge ausgeglichen werden und somit zu keinem Phänotypen führen. Umgekehrt können Effekte im Reporterassay als gering eingeschätzt werden, die im Organismus durch verstärkende Faktoren relevante Auswirkungen haben. Entscheidend ist unter anderem, ob in den verwendeten Zellen die zu untersuchenden miRNAs vorkommen, da große Mengen endogener miRNA die Wirkung von künstlich eingebrachten miRNA-*mimics* verdecken können. Aus diesem Grund wurde sich in dem hier verwendeten Assay für *HeLa*-Zellen entschieden, die für solche Experimente als Standardzelllinie gelten (Jin *et al.*, 2013). Die Recherche in miRmine ergab jedoch, dass durchaus einige der untersuchten miRNAs auch in *HeLa*-Zellen exprimiert werden. Die höchsten Expressionsraten haben dabei hsa-let-7f, hsa-miR-31 und hsa-miR-26 (Tabelle 15). Da endogene miRNAs Effekte der miRNA-*mimics* verdecken können, kann für hsa-miR-31 und hsa-miR-26 ein falsch negatives Ergebnis im Luziferaseassay nicht ausgeschlossen werden. Vor diesem Hintergrund ist der trotzdem messbare Effekt von hsa-let-7f umso relevanter. Die beiden anderen miRNA-*mimics* mit Effekt (hsa-miR-708 und hsa-miR-184) kommen endogen nicht in *HeLa*-Zellen vor und dürften daher keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Ihre Abwesenheit wurde zusätzlich mittels qPCR bestätigt. Die Überprüfung aller weiteren untersuchten miRNAs mittels qPCR, insbesondere von hsa-let-7f, wäre sinnvoll. Aus Zeitgründen wurde darauf im Rahmen dieser Arbeit jedoch verzichtet.

Zusätzlich wurde mittels qPCR getestet, ob *HeLa*-Zellen PR3-mRNA bilden (Tabelle 17 ,Tabelle 24). Dabei konnten die Ergebnisse von Pieters *et al.*, 2004 reproduziert werden. Es ist somit davon auszugehen, dass *HeLa*-Zellen keine relevanten Mengen Proteinase 3 exprimieren. Der Nachweis von geringen Mengen PR3-cDNA in der *no-template*-Kontrolle deutet auf eine Verunreinigung hin, die jedoch für das Versuchsergebnis nicht von Relevanz ist.

5.1.2 Kontrollen

Als Negativkontrolle für die miRNA-*mimics* wurde die *miRIDIAN Negative Control #1* verwendet. Es handelt sich dabei laut Datenblatt um ein cel-miR-67-*mimic*, eine miRNA aus *C. elegans*, die in humanen Zellen keine bekannten Ziel-mRNAs hat. Der Unterschied in der Luziferaseaktivität zu Zellen, die nur mit Medium transfiziert wurden (MOC) ist gering (Tabelle 25, Tabelle 26). Nichtsdestotrotz übt auch dieses miRNA-*mimic*, wie jede transfizierte RNA, unspezifische Effekte auf

die Zellen aus. Die cel-miR-67 wurde daher zur Normierung auf 100 % gesetzt und alle miRNA-*mimic* Effekte relativ zu diesem unspezifischen Effekt betrachtet.

Als eine weitere Negativkontrolle diente die NTC-Kontrolle, die für jedes miRNA-*mimic* durchgeführt wurde. Es handelt sich dabei um den unveränderten pmirGLO Vektor, der zusammen mit dem jeweiligen miRNA-*mimic* transfiziert wurde. Jede miRNA-Wirkung auf dieses Plasmid muss als unspezifisch gelten, da keine 3'UTR vorhanden ist. Bei der Auswertung wurde daher die Differenz zwischen NTC und der zu untersuchenden 3'UTR betrachtet und als spezifische Wirkung des miRNA-*mimic* gedeutet. Da theoretisch auch die 3'UTR selbst die Stabilität der mRNA beeinflussen kann, wäre eine nur in der miRNA-Bindungsstelle mutierte 3'UTR die bessere Kontrolle (Svoboda, 2015). Da jedoch für diesen Ansatz alle Bindungsstellen bekannt sein müssen und für jede der 22 miRNAs unterschiedliche Mutationen eingebracht werden müssten, war diese Art der Kontrolle bei den hier durchgeführten Versuchen nicht möglich. Zur Verifizierung der gefundenen miRNAs mit Effekt und für die Suche nach den tatsächlichen Bindungsstellen, wäre die gezielte Mutation von vorhergesagten Bindungssequenzen für hsa-let-7f, hsa-miR-708 und hsa-miR-184 eine sinnvolle Fortsetzung dieses Projekts.

Als Positivkontrolle des Assays wurde die 3'UTR von AKT2 verwendet. Es handelt sich dabei um ein bereits experimentell erprobtes Ziel von hsa-miR-184 (Foley *et al.*, 2010). Auch im hier verwendeten Versuchsaufbau lässt sich der beschriebene Effekt in einer ähnlichen Größenordnung nachweisen, daher kann davon ausgegangen werden, dass das Reportersystem prinzipiell funktioniert. Die Doppelnutzung von hsa-miR-184 als zu untersuchende miRNA und als Positivkontrolle birgt die Gefahr eines unerkannten systemischen Fehlers. Dies wird in diesem Assay durch die *no-target*-Kontrolle berücksichtigt. Hätte hsa-miR-184 einen unspezifischen Effekt, so wäre dieser Effekt auch bei der *no-target*-Kontrolle sichtbar. Weiterhin zeigt hsa-miR-184 keinen Effekt auf die alternative PR3-3'UTR, was ebenfalls eine falsch positive Wirkung von hsa-miR-184 ausschließt.

5.2 Effekte der miRNA-*mimics* auf die PR3-3'UTR und alternative PR3-3'UTR

Im Durchschnitt sind humane 3'UTRs ca. 1200 Nukleotide lang (Mayr, 2017). Mit 206 Nukleotiden ist die humane PR3-3'UTR vergleichsweise kurz und bietet somit relativ wenige Sequenzen zur miRNA-Bindung. Dementsprechend zeigt die Mehrzahl der untersuchten miRNAs keine direkte Wirkung auf die 3'UTR der Proteinase 3. Dies schließt jedoch eine Rolle dieser miRNAs in der Pathogenese der GPA nicht aus, zumal auch miRNA Bindungsstellen in kodierenden Bereichen oder der 5'UTR von mRNAs gefunden wurden (Ørom, Nielsen & Lund, 2008). Ebenso ist eine anderweitige Regulation der PR3 zum Beispiel durch Veränderungen an der Promotoraktivität als auch die Interaktion mit anderen Pathogenitätsfaktoren möglich.

5.2.1 Unterschiede zwischen den miRNA-*mimics* und der Negativkontrolle cel-miR-67

In Abbildung 11 und Abbildung 12 ist zu erkennen, dass bei einigen miRNA-*mimics* (hsa-miR-1271, hsa-miR-214-5p, hsa-miR-572, hsa-miR-1825) die Luziferaseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle cel-miR-67 herunterreguliert ist. Dies tritt sowohl bei den Experimenten mit der PR3-3'UTR, als auch bei der alternativen 3'UTR und auch bei Transfektion des unveränderten pmirGLO Vektors (NTC) auf. Umgekehrt ist die Luziferaseaktivität bei hsa-miR-31 immer oberhalb der Negativkontrolle. Die Ursachen dieser Phänomene sind unbekannt. Möglich wären Effekte dieser miRNA-*mimics* auf die Promotoraktivität der *Firefly*- oder *Renilla*-Luziferase. Wird der Promotor der *Firefly*-Luziferase herunterreguliert, nicht aber der Promotor der *Renilla*-Luziferase, so sinkt die relative Luziferaseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle. Für die *Renilla*-Luziferase gilt das Gegenteil. Auch die indirekte Hochregulation der Promotoren durch die miRNA-*mimics* wäre denkbar. Unspezifische Effekte wie ein vermehrter Zelltod oder die Hemmung des RISC sind hingegen wahrscheinlich nicht Grund dieser Abweichungen, da in diesem Fall beide Luziferasen betroffen wären und somit der *F/R*-Quotient konstant bliebe. Da solche Ergebnisse bei miRNA-Überexpressionsversuchen bereits bekannt sind (Svoboda, 2015), wurde in dieser Arbeit zusätzlich zu jeder Probe eine NTC-Kontrolle bearbeitet und nur die Unterschiede zwischen Probe und NTC als spezifischer Effekt gewertet.

5.2.2 Unterschiede zwischen der miRNA-Wirkung auf 3'UTR und NTC

Die spezifischen Effekte der meisten miRNA-*mimics* sind gering und nicht signifikant. Da dies zu erwarten war, wird hierdurch die Aussagekraft des Assays gestärkt. In der Regel fungieren miRNAs als Repressoren oder Destabilisatoren ihrer Ziel-mRNA (Bartel, 2018). In den hier durchgeführten Versuchen kommt es bei einigen miRNA-*mimics* vor, dass die NTC eine verringerte Luziferaseaktivität im Vergleich zur untersuchten 3'UTR hat (siehe zum Beispiel hsa-miR-708 in Abbildung 11, Tabelle 19) und somit ein scheinbar hochregulierender Effekt des miRNA-*mimic* auftritt. Es wurden zwar vereinzelt solche aktivierenden Effekte von miRNAs auf Ziel-mRNAs zuvor beschrieben (Ge *et al.*, 2018). Da dies jedoch äußerst selten vorkommt, und keiner der hier beobachteten aktivierenden Effekte statistisch signifikant ist, handelt es sich am wahrscheinlichsten um zufällige Fehler.

5.2.3 MiRNA-*mimics* mit Effekt auf die PR3-3'UTR

Die beiden miRNA-*mimics* hsa-miR-184 und hsa-let-7f haben eine statistisch signifikante hemmende Wirkung auf die Expression der PR3-3'UTR. Die miRNA mit der höchsten Überexpression bei GPA-Patienten in den Vorarbeiten von Schinke *et al.* war ebenfalls hsa-miR-184. Beides zusammen deutet auf eine biologisch relevante Funktion dieser miRNA in der Pathogenese der GPA hin. Um sicherzugehen, dass die Resultate nicht zufällig sind, wurden die Versuche mit hsa-miR-184 sechs Mal

(n = 6) durchgeführt. Es ist daher davon auszugehen, dass die beobachtete Inhibition kein zufälliger Fehler ist.

Die miRNA let-7f wird laut Schinke *et al.* bei GPA-Patienten vermindert exprimiert. Ihr Effekt auf die 3'UTR der Proteinase 3 scheint mit 12,3 % zunächst gering, liegt jedoch im erwartbaren Rahmen der miRNA-Effekte (Selbach *et al.*, 2008). Inwieweit die hier *in vitro* beobachtete Inhibition bei Primärzellen wie Neutrophilen Granulozyten eine biologisch relevante Wirkung hat, muss mit weiteren Experimenten erforscht werden. Da jede Zelle durch ein komplexes miRNA-Netzwerk reguliert wird, könnte es sein, dass viele solch geringe Effekte mehrerer miRNAs in Summe eine relevante Wirkung erzielen.

5.2.4 MiRNA-*mimics* mit Effekt auf die alternative PR3-3'UTR

Auf die alternative PR3-3'UTR wirkte ebenfalls hsa-let-7f expressionshemmend. Mit 29,2 % war ihr Effekt auf die alternative 3'UTR stärker als auf die kanonische 3'UTR (12,3 %). Eine Begründung hierfür könnte in der verlängerten 3'UTR-Sequenz liegen. Es könnte sein, dass die alternative 3'UTR zusätzliche Bindungsstellen für let-7f aufweist und dadurch mehrfache Bindungen möglich sind.

Neu aufgetreten war die Hemmung durch hsa-miR-708 (23,6 %). Dieses miRNA-*mimic* zeigte keinen Effekt auf die kanonische PR3-3'UTR, sondern ausschließlich auf die alternative 3'UTR. Auch diese Wirkung wäre gut mit der Hypothese zusätzlicher Bindungsstellen erklärbar.

Hsa-miR-184 hatte hingegen im Gegensatz zur normalen 3'UTR (17,5 %) keine signifikante Wirkung auf die alternative 3'UTR (4,5 %). Ein Wirkverlust durch zusätzliche Nukleotide erscheint zunächst ungewöhnlich. In der Literatur wird ein solches Phänomen jedoch auch bei anderen miRNAs beschrieben und durch das Bindungsverhalten erklärt. MiRNAs, die an den 5'- oder 3'-Enden der 3'UTR binden haben eine stärkere Wirkung auf die Ziel-mRNA als miRNAs, die mittig an die 3'UTR binden (Hoffman *et al.*, 2016). Dieser Effekt könnte auch bei hsa-miR-184 aufgetreten sein. Da sie die miRNA mit der stärksten Inhibition auf die kanonische PR3-3'UTR war, liegt ihre Bindungsstelle möglicherweise am 3'-Ende der 3'UTR. Wird die UTR nun durch zusätzliche Nukleotide verlängert, so würde ihre Bindungsstelle weiter in die Mitte wandern und ihre Wirkung nachlassen (siehe Abbildung 13). Um diese Hypothese zu überprüfen müsste die Bindungsstelle identifiziert werden.

Die Arbeit mit der alternativen PR3-3'UTR ist nicht unproblematisch. Da in der Sequenz viele repetitive Elemente vorkommen, musste der Rückwärtsprimer so gestaltet werden, dass er 58 Nukleotide in 3'-Richtung hinter der alternativen Polyadenylierungsstelle bindet. Dadurch ist die Sequenz, die in den pmirGLO Vektor kloniert wurde, 344 statt 286 Nukleotide lang. Findet die Polyadenylierung nun an der alternativen Poly-A-Stelle statt, so entsteht wie erwartet eine 286 Nukleotide lange alternative 3'UTR gekoppelt an die *Firefly*-mRNA. Wie im Kapitel 1.3 beschrieben, ist es jedoch auch möglich, dass die Polyadenylierung an der proximalen Poly-A-Stelle oder an keiner von beiden, sondern an der im Vektor vorhandenen Poly-A-Stelle weiter distal stattfindet. In diesen

Fällen würde die normale 3'UTR oder eine noch deutlich längere 3'UTR entstehen. Der Luziferaseassay zeigt das gemittelte Ergebnis aller *HeLa*-Zellen eines Wells. Welche 3'UTR in jeder einzelnen Zelle gebildet wird ist nicht darstellbar und Effekte dieser beiden ungewollten 3'UTRs könnten falsch positive oder falsch negative Ergebnisse erzeugen.

5.2.5 Erklärungsmodell für die beobachteten miRNA-Effekte

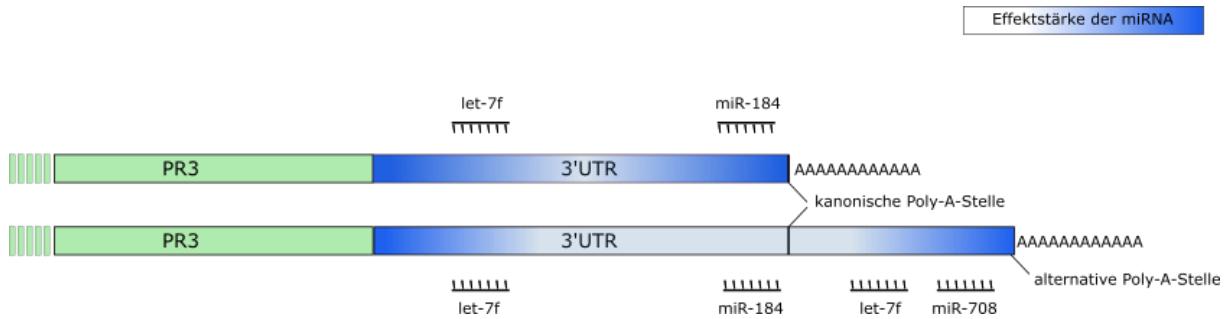


Abbildung 13: Hypothetische Bindungsstellen der miRNAs als Modell zur Erklärung der beobachteten miRNA-Effekte. Die miRNAs let-7f und miR-184 haben Bindungsstellen in der regulären 3'UTR der PR3. Die Wirkung der miR-184 ist bei der alternativen 3'UTR verringert, da ihre Bindungsstelle weiter in der Mitte der UTR liegt. Die Wirkung von let-7f wird verstärkt, da eine zusätzliche Bindungsstelle hinzukommt. MiR-708 kann nur an der alternativen 3'UTR binden.

5.3 Interpretation der Ergebnisse und Modell der Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der Granulomatose mit Polyangiitis ist sehr komplex und bisher nur in Teilen verstanden (Lamprecht *et al.*, 2018). Da in dieser Arbeit nur der Effekt der miRNAs auf die PR3 untersucht wurde und die gefundenen miRNAs noch nicht umfassend charakterisiert wurden, ist die Interpretation der Ergebnisse schwierig. Es ist durchaus möglich, dass die miRNAs weitere Ziele haben, die die Immunantwort über andere Mechanismen beeinflussen. Trotzdem werden im folgenden Kapitel die bisherigen *in vitro* Ergebnisse verwendet um Hypothesen zu den Funktionen der miRNAs hsa-miR-184, hsa-let-7f und hsa-miR-708 in der Pathophysiologie der GPA aufzustellen.

5.3.1 Funktion von hsa-miR-184

Über die Funktion der miRNA 184 ist bisher wenig bekannt. Am häufigsten wurde sie bisher in der Augenheilkunde untersucht, wo sie an Augenerkrankungen wie der Myopie oder dem Keratokonus beteiligt ist (Lagos-Quintana *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2017). Derrik *et al.* konnten außerdem eine inverse Korrelation zwischen Bindehautentzündungen und hsa-miR-184 Expression bei Chlamydieninfektionen des Auges nachweisen (Derrick *et al.*, 2016). Dort postuliert wurde eine immunmodulierende Wirkung von hsa-miR-184, die zu einer verbesserten Eliminierung der Chlamydien aber auch zu einer verlängerten Wundheilung und verstärkten Narbenbildung führt. Bei verschiedenen Tumorerkrankungen wurde zudem eine veränderte hsa-miR-184 Expression nachgewiesen, darunter das Prostatakarzinom oder Hirntumore (Schaefer *et al.*, 2009; Emdad *et al.*,

2015). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Schinke *et al.* waren dort jedoch die miR-184 Spiegel verringert. Auch Foley *et al.* kommen zu dem Schluss, dass die hsa-miR-184 einen protektiven Effekt bei Patienten mit Neuroblastom ausübt (Foley *et al.*, 2010). In der Rheumatologie wurde die miR-184 bisher erst in einer Forschungsarbeit erwähnt. Wuttge *et al.* fanden heraus, dass es Expressionsunterschiede der miRNA zwischen limitiert kutaner- und diffus kutaner Systemischer Sklerose gibt (Wuttge *et al.*, 2015). Zwei für das Immunsystem wichtige Ziele der miRNA-184 sind außerdem „Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2“ (NFATC2) (Weitzel *et al.*, 2009) und „B-cell lymphoma 2“ (BCL2) (Zhen *et al.*, 2013).

Falls eine Verallgemeinerung von miRNA-Effekten überhaupt möglich ist, so scheint miR-184 bei Tumoren herunterreguliert zu sein und die Überexpression eher antiproliferative Wirkung zu haben. Bei der Granulomatose mit Polyangiitis war sie überexprimiert und hatte einen hemmenden Einfluss auf die Expression von Proteinase 3, daher scheint sie bei GPA-Patienten eher als Antwort auf eine überschießende Entzündungsreaktion hochreguliert zu sein. Möglicherweise fungiert hsa-miR-184 somit als Schutzmechanismus und verhindert noch ausgeprägtere Gewebsschädigung. Bei Patienten mit PR3-Transkripten mit alternativer 3'UTR kann die protektive Wirkung jedoch nicht im vollen Umfang stattfinden.

5.3.2 Funktion von hsa-let-7f

Die miRNA let-7f ist unter den drei hier gefundenen relevanten miRNAs am besten untersucht. Neben verschiedenen Effekten auf Krebszellen hat sie auch einen Einfluss auf das Immunsystem und ist daher im Kontext der Granulomatose mit Polyangiitis äußerst interessant. Es konnte gezeigt werden, dass let-7f einen hemmenden Einfluss auf B-Zellen und somit auf die Produktion von IgM-Antikörpern hat (Jiang *et al.*, 2018). Außerdem wurde die Wirkung von let-7f auf Th17-Zellen untersucht und festgestellt, dass let-7f einen hemmenden Einfluss auf die Produktion von IL-17 und IL-23R hat (Li *et al.*, 2011). Fehlregulierte Th17-Zellen sind häufig mit der Entstehung von Autoimmunität und Entzündung assoziiert, so auch bei der GPA (Wilde *et al.*, 2012). Ein weiterer wichtiger Zelltyp, der von let-7f reguliert werden kann, sind Makrophagen. So wurde gezeigt, dass SOCS4, ein Repressor von Zytokinen durch let-7f in Makrophagen gehemmt wird. Bei Infektionen im Mundraum wird let-7f verringert exprimiert, was zu einer gesteigerten Zytokinantwort führt (Naqvi *et al.*, 2014). Außerdem wurde herausgefunden, dass let-7f ein wichtiger Faktor in der Immunantwort bei Tuberkulose ist (Kumar *et al.*, 2015). Hier scheint let-7f zwar eher eine proinflammatorische Antwort der Makrophagen zu bewirken, nichtsdestotrotz zeigt auch die Arbeit von Kumar *et al.*, dass let-7f als Feinregulator des Immunsystems fungiert. Weitere regulatorische Wirkungen hat let-7f bei der Angiogenese. So konnten Dharhi *et al.* zeigen, dass gesteigerte let-7f-Konzentrationen eine forcierte Neovaskularisierung und somit eine verbesserte Durchblutung mit sich bringen (Dhahri *et al.*, 2017). Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass die von Schinke *et al.* gefundene verringerte let-7f-Expression leichter zu hypoxischen Zuständen führen und somit die Nekrosen bei der GPA

verstärken könnte. In den hier durchgeführten Experimenten zeigte hsa-let-7f eine Inhibition der Proteinase 3 und wirkt somit der Krankheit entgegen. Wenn let-7f bei GPA-Patienten verringert gebildet wird, führt dies zur vermehrten PR3-Expression, was wiederum die Bildung der ANCA begünstigt.

5.3.3 Funktion von hsa-miR-708

Wie viele andere miRNAs spielt auch hsa-miR-708 eine Rolle bei verschiedenen Tumorerkrankungen. Zusammengefasst scheint die miRNA 708 bei den meisten Krebserkrankungen als Tumorsuppressor zu fungieren und ist häufig in Tumorzellen herunterreguliert. Einen ausführlichen Überblick über die Funktion von miR-708 bei Tumoren gibt ein Review von Sun *et al.*, 2019. In der Rheumatologie wurde bisher gezeigt, dass miR-708 in Fibroblasten und mononukleären Zellen des Blutes von Patienten mit Systemischer Sklerose überexprimiert wird (Ebrahimiyan *et al.*, 2019; Vahidi Manesh *et al.*, 2019) und, dass die miRNA als protektiver Faktor bei Rheumatoider Arthritis wirkt (Wu *et al.*, 2018). Über die Wirkung von miR-708 in der Pathogenese der Granulomatose mit Polyangiitis kann bisher hingegen nur spekuliert werden. Die tumorsuppressive Wirkung könnte auf eine Steigerung der Immunantwort durch miR-708 hindeuten, was eine pathologische Wirkweise bei der GPA nahelegen würde. Dem widerspricht jedoch die protektive Wirkung bei RA, was eher auf eine regulative Wirkung bei rheumatischen Erkrankungen schließen lässt. Dies würde auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmen, da hsa-miR-708 keine Wirkung auf die normale PR3-3'UTR aufweist, hingegen auf die vermutlich pathologische alternative 3'UTR einen hemmenden Effekt hat.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit und vermutete Rollen der miRNAs in der Pathogenese der GPA.

miRNA	Expression	Wirkung auf die PR3	Wirkung auf die alternative PR3	Vermutete Rolle in der Pathogenese der GPA	Erklärung
let-7f	↓	hemmend	hemmend	Ursächlich an der Erkrankung beteiligt	Hemmt physiologisch die PR3. Bei GPA-Patienten ist sie erniedrigt, dadurch wird vermehrt PR3 exprimiert und ANCA gebildet.
miR-708	↑	-	hemmend	Reaktive Bildung zur Eindämmung der Entzündung	Inhibiert die pathologisch erhöhte alternative PR3-mRNA.
miR-184	↑	hemmend	-	Reaktive Bildung zur Eindämmung der Entzündung	Reguliert normalerweise PR3 herunter. Dies ist für die alternative 3'UTR nicht möglich, daher kommt es zur reaktiven Überexpression von miR-184 ohne Effekt.

5.4 Weiterführende Experimente

Zur Validierung der hier gefundenen Effekte von miRNAs auf PR3 oder PR3 mit alternativer 3'UTR sind Versuche mit Zellen nötig, die PR3 endogen exprimieren. Unter den Tumorzelllinien ist eine relevante Expression von Proteinase 3 in *U937*, *NB-4* und *HL60* Zellen zu finden (Pieters *et al.*, 2004), wobei die Expression in *U937* Zellen so gering ist, dass sie für Experimente ungeeignet erscheinen. Vorarbeiten der Gruppe haben gezeigt, dass *HL60* Zellen sehr schwer zu transfizieren sind, daher würden sich vor allem *NB-4* Zellen für weitergehende Versuche anbieten. Anderen Gruppen ist die Transfektion dieser Zellen bereits gelungen (Wang *et al.*, 2012). Nach Etablierung eines Transfektionsprotokolls mit miRNA-*mimics* kommen dann sowohl Westernblot, als auch qPCR als mögliche Nachweismethoden für die PR3 in Frage. Da die Halbwertszeit von bereits gebildeter Proteinase 3 in den Zellen unklar ist und die Effekte der miRNA-*mimics* eher schwach sind, scheint der Western Blot problematisch. Auf der anderen Seite ist nicht klar, ob die Effekte der miRNA-*mimics* auf Transkriptions- oder Translationsebene stattfinden, was in der qPCR zu falsch negativen Ergebnissen führen könnte. Aufgrund der höheren Wahrscheinlichkeit für die Regulation auf Transkriptionsebene (Eichhorn *et al.*, 2014) sollte trotzdem zuerst die qPCR angestrebt werden.

Um Effekte auf die alternative PR3 in Tumorzellen nachweisen zu können, müsste zunächst überprüft werden, ob mRNAs mit alternativer 3'UTR in diesen Zellen vorkommen. Sollte dies nicht der Fall sein, könnten Tumorzelllinien zum Beispiel mittels CRISPR-Cas9 spezifisch verändert werden um die alternative PR3-3'UTR zu exprimieren. Andernfalls müsste auf Primärzellen von GPA-Patienten zurückgegriffen werden, wobei eine erfolgreiche Transfektion mit miRNA-*mimics* von humanen Neutrophilen oder Monozyten fraglich ist.

Weiterhin ist unklar, in welchen Zellen der Nasenschleimhautproben die miRNAs differenziell exprimiert werden. Erstrebenswert wären daher Experimente, die die Verteilung der verschiedenen miRNAs in einzelnen Zellpopulationen darstellen können. Um eine Vorstellung zu bekommen, welche Zellen für die veränderte miRNA-Expression verantwortlich sind, wären Einzelzell-Transkriptom-Analysen ideal. Es handelt sich dabei jedoch um eine relativ neue und aufwendige Methode (Aldridge & Teichmann, 2020). Außer der Proteinase 3, sind einige weitere Faktoren wie PTPN22, Alpha-1-antitrypsin oder LAMP2 mit aktiver GPA korreliert worden (Kitching *et al.*, 2020). Mit einer vergleichenden Exom-/Transkriptom-Sequenzierung wäre die Untersuchung von Effekten der miRNAs auf diese Ziele möglich. Gleichzeitig könnten mit dieser Methode weiterer Ziele des bei der GPA-spezifisch veränderten miRNA-Profiles gefunden werden.

5.5 Bedeutung der Ergebnisse für Diagnostik und Behandlung der GPA

MiRNAs können sowohl als diagnostische Marker, als auch für die Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden (Bonneau *et al.*, 2019). Für die GPA besteht mit der etablierten PR3-ANCA-Testung bereits ein spezifischer, aber wenig sensitiver diagnostischer Marker. Die Testung auf eine GPA-spezifische miRNA-Signatur könnte die Diagnostik in unklaren Fällen erweitern. MiRNAs können auch aus Schleimhautabstrichen (Ho *et al.*, 2017) oder Urin (Weber *et al.*, 2010) bestimmt werden. Für die klinische Testung wären Analysen der miRNA-Signatur interessant, wenn sie die Krankheitsaktivität in einzelnen Organen wie der Nasenschleimhaut oder der Niere anzeigen könnten. Ob dies möglich ist, muss jedoch zunächst untersucht werden.

Des Weiteren wäre es für die Prognose und Therapiesteuerung interessant zu erforschen, wie sich die miRNA-Signatur durch eine Therapie ändert. Dazu müsste untersucht werden, ob es prognostisch ungünstige oder besonders günstige Signaturen gibt wie es zum Beispiel für Lymphome bereits gezeigt wurde (Roehle *et al.*, 2008).

Klinisch bedeutend wäre außerdem eine zielgerichtete Behandlung der GPA durch miRNA-Therapeutika. Bei anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel der chronischen Herzinsuffizienz, wurden bereits erste Erfolge durch miRNA-Therapeutika in klinischen Studien erzielt (Täubel *et al.*, 2021). Die in dieser Arbeit identifizierten miR-184, -708 und -let-7f könnten als Kandidaten für ähnliche Therapieansätze in Frage kommen. Zunächst sollte dafür die Rolle dieser miRNAs in der GPA-Pathogenese weiter charakterisiert werden. Ist eine miRNA krankheitsfördernd, könnte sie durch eine *AntagomiR* inhibiert werden. Wirkt eine miRNA hingegen protektiv, so wären therapeutische miRNA-*mimics* eine mögliche Therapiestrategie. Voraussetzung und Nadelöhr für die Entwicklung von RNA-basierten Therapien bleibt jedoch die Entwicklung zielgerichteter Lieferungssysteme, um die applizierte RNA effizient an den Ort der Entzündung zu bringen.

Die hier erstmalig beschriebene direkte Wirkung von miRNAs auf die Proteinase 3, dem Hauptantigen der Granulomatose mit Polyangiitis, bildet eine Grundlage für künftige Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten.

6 Zusammenfassung

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ist eine Kleingefäßvaskulitis, die alle Organe des Menschen betreffen kann und unbehandelt tödlich verläuft. Die Ursachen der Erkrankung sind komplex und bisher nicht vollständig aufgeklärt. Krankheitsspezifische Anti-Neutrophilen zytoplasmatische Autoantikörper (ANCA) und deren Zielantigen Proteinase 3 (PR3) sind wesentlich an der Pathogenese beteiligt. Eine erhöhte PR3-mRNA-Expression korreliert mit der Vaskulitisaktivität. Epigenetische Veränderungen bei GPA-Patienten sind mit einer verstärkten PR3-Expression assoziiert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei GPA-Patienten auch alternative PR3-mRNAs vorkommen, deren Funktion bislang jedoch unbekannt ist. PR3-regulierende MicroRNAs (miRNAs) wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben. MiRNAs sind 21-23 Nukleotide lange, nicht kodierende RNA-Moleküle, die durch die Bindung an die 3' untranslatierte Region (3'UTR) von mRNAs die Proteinexpression herabsetzen. Sowohl bei Tumorerkrankungen als auch bei Autoimmunerkrankungen konnte gezeigt werden, dass fehlregulierte miRNAs an der Pathogenese beteiligt sind. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ergaben, dass 16 miRNAs im Gewebe von GPA-Patienten im Vergleich zu Kontrollen unterexprimiert werden und somit zur erhöhten PR3-mRNA-Expression beitragen könnten. Weitere fünf miRNAs werden überexprimiert, was möglicherweise auf eine Reaktion des Körpers auf die überschießende Entzündung hinweist. *In silico*-Analysen ergaben Bindungen einiger dieser miRNAs an die mRNA der PR3. Ziel dieser Doktorarbeit war es, experimentell zu überprüfen, ob die bei der GPA dysregulierten miRNAs die PR3-mRNA oder eine alternative PR3-mRNA regulieren. Dazu wurde ein dualer Luziferase-Reporterassay etabliert. Die 3'UTR der PR3 bzw. die alternative 3'UTR wurden mittels Klonierung mit einem Luziferasegen fusioniert. Die so entstandenen Plasmide wurden zusammen mit synthetischen miRNAs in *HeLa*-Zellen transfiziert und die Aktivität der Luziferase wurde gemessen. Für 2 der 21 untersuchten miRNAs konnte eine signifikante Wirkung auf die 3'UTR der PR3 im Vergleich zur Negativkontrolle gezeigt werden. Die Inhibition durch hsa-miR-184 betrug 17,5 % und durch hsa-let-7f 12,3 %. Auf die alternative 3'UTR der PR3 wirkte sich ebenfalls hsa-let-7f mit einer Reduktion der Luziferaseaktivität von 29,2 % aus. Anders als bei der kanonischen 3'UTR zeigte hier außerdem hsa-miR-708 einen signifikanten Effekt (23,6 %). Hingegen bewirkte hsa-miR-184 bei der alternativen 3'UTR keine Reduktion der Luziferaseaktivität. Zusammengefasst konnte somit erstmalig eine direkte Regulation der PR3-Expression durch GPA-spezifische MicroRNAs nachgewiesen werden. Zudem wurde gezeigt, dass auch die GPA-assoziierte alternative PR3-mRNA durch andere miRNAs reguliert wird, was auf eine mögliche Bedeutung der alternativen mRNA in der Pathogenese der GPA hinweist. Die hier gefundenen miRNA-Effekte auf die PR3-mRNA-Expression können als Grundlage für zukünftige zielgerichtete RNA-Therapeutika dienen. Größer angelegte Versuche wie eine vergleichende Exom-/Transkriptom-Sequenzierung von Einzelzellen wären ein weiterer sinnvoller Schritt zur Erforschung des komplexen miRNA-Netzwerks bei der Pathogenese der GPA.

Literaturverzeichnis

- Agarwal, V. et al. (2015) 'Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs.', *eLife*. eLife Sciences Publications, Ltd, 4. doi: 10.7554/eLife.05005.
- Aldridge, S. und Teichmann, S. A. (2020) 'Single cell transcriptomics comes of age', *Nature Communications*. Nature Research. doi: 10.1038/s41467-020-18158-5.
- Ambros, V. et al. (2003) 'A uniform system for microRNA annotation.', *RNA* (New York, N.Y.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 9(3), pp. 277–9. doi: 10.1261/rna.2183803.
- Anderson, P. (2010) 'Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 24–35. doi: 10.1038/nri2685.
- Bandara, K. V., Michael, M. Z. und Gleadle, J. M. (2017) 'MicroRNA Biogenesis in Hypoxia', *MicroRNA*. Bentham Science Publishers Ltd., 6(2), pp. 80–96. doi: 10.2174/2211536606666170313114821.
- Bartel, D. P. (2004) 'MicroRNAs', *Cell*. Elsevier, 116(2), pp. 281–297. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- Bartel, D. P. (2018) 'Metazoan MicroRNAs.', *Cell*. Elsevier, 173(1), pp. 20–51. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006.
- Bertram, A. et al. (2015) 'Circulating ADAM17 Level Reflects Disease Activity in Proteinase-3 ANCA-Associated Vasculitis', *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(11), pp. 2860–2870. doi: 10.1681/ASN.2014050477.
- Bonneau, E. et al. (2019) 'How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market.', *EJIFCC*. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 30(2), pp. 114–127.
- Campanelli, D. et al. (1990) 'Cloning of cDNA for proteinase 3: A serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils', *Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press, 172(6), pp. 1709–1715. doi: 10.1084/jem.172.6.1709.
- Carpenter, S. et al. (2014) 'Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 14(6), pp. 361–376. doi: 10.1038/nri3682.
- Chakraborty, C. et al. (2021) 'Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update', *Journal of Advanced Research*. Elsevier B.V., pp. 127–138. doi: 10.1016/j.jare.2020.08.012.
- Chen, W. et al. (2017) 'Alternative Polyadenylation: Methods, Findings, and Impacts Methods and Findings of Alternative Polyadenylation', *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. Beijing Genomics Institute, pp. 287–300. doi: 10.1016/j.gpb.2017.06.001.
- Chen, W. et al. (2019) 'The function of ncRNAs in rheumatic diseases', *Epigenomics*. Future Medicine Ltd London, UK, 11(7), pp. 821–833. doi: 10.2217/epi-2018-0135.
- Ciavatta, D. J. et al. (2010) 'Epigenetic basis for aberrant upregulation of autoantigen genes in humans with ANCA vasculitis', *Journal of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/JCI40034.
- Cimmino, A. et al. (2005) 'miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(39), pp. 13944–9. doi: 10.1073/pnas.0506654102.
- Dekkema, G. J. et al. (2019) 'Increased miR-142-3p Expression Might Explain Reduced Regulatory T Cell Function in Granulomatosis With Polyangiitis', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 10. doi: 10.3389/fimmu.2019.02170.
- Derrick, T. et al. (2016) 'Inverse relationship between microRNA-155 and -184 expression

with increasing conjunctival inflammation during ocular Chlamydia trachomatis infection.', *BMC infectious diseases*. BioMed Central, 16, p. 60. doi: 10.1186/s12879-016-1367-8.

Dhahri, W. et al. (2017) 'Reduced expression of let-7f activates TGF- β /ALK5 pathway and leads to impaired ischaemia-induced neovascularization after cigarette smoke exposure', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 21(9), pp. 2211–2222. doi: 10.1111/jcmm.13144.

Ebrahimiyan, H. et al. (2019) 'microRNAs are potentially regulating the survivin gene in PBMCs from systemic sclerosis patients', *Modern Rheumatology*, pp. 1–8. doi: 10.1080/14397595.2019.1659545.

Eichhorn, S. W. et al. (2014) 'mRNA Destabilization Is the Dominant Effect of Mammalian MicroRNAs by the Time Substantial Repression Ensues', *Molecular Cell*. Cell Press, 56(1), pp. 104–115. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2014.08.028.

Emdad, L. et al. (2015) 'Suppression of miR-184 in malignant gliomas upregulates SND1 and promotes tumor aggressiveness', *Neuro-Oncology*, 17(3), pp. 419–429. doi: 10.1093/neuonc/nou220.

Fasseu, M. et al. (2010) 'Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 5(10). doi: 10.1371/journal.pone.0013160.

Foley, N. H. et al. (2010) 'MicroRNA-184 inhibits neuroblastoma cell survival through targeting the serine/threonine kinase AKT2.', *Molecular cancer*. BioMed Central, 9, p. 83. doi: 10.1186/1476-4598-9-83.

Friedman, R. C. et al. (2009) 'Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.', *Genome research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 19(1), pp. 92–105. doi: 10.1101/gr.082701.108.

Fromm, B. et al. (2015) 'A Uniform System for the Annotation of Vertebrate microRNA Genes and the Evolution of the Human microRNAome', *Annual Review of Genetics*, 49(1), pp. 213–242. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092023.

Fujinaga, M. et al. (1996) 'The crystal structure of PR3, a neutrophil serine proteinase antigen of Wegener's granulomatosis antibodies', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 261(2), pp. 267–278. doi: 10.1006/jmbi.1996.0458.

Ge, W. et al. (2018) 'Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation', *Frontiers in Endocrinology* | www.frontiersin.org. Frontiers, 1, p. 402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402.

Graham, R. R. et al. (2007) 'Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 104(16), pp. 6758–6763. doi: 10.1073/pnas.0701266104.

Greco, A. et al. (2016) 'Clinic manifestations in granulomatosis with polyangiitis.', *International journal of immunopathology and pharmacology*. SAGE Publications, 29(2), pp. 151–9. doi: 10.1177/0394632015617063.

Griffiths-Jones, S. et al. (2006) 'miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature', *Nucleic Acids Research*. 34(90001), pp. D140–D144. doi: 10.1093/nar/gkj112.

Grimson, A. et al. (2007) 'MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing.', *Molecular cell*. NIH Public Access, 27(1), pp. 91–105. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.017.

Gruber, A. J. und Zavolan, M. (2019) 'Alternative cleavage and polyadenylation in health and disease', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, pp. 599–614. doi: 10.1038/s41576-019-0145-z.

- De Guire, V. et al. (2013) 'Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: Promises and challenges', *Clinical Biochemistry*. Elsevier, 46(10–11), pp. 846–860. doi: 10.1016/J.CLINBIOCHEM.2013.03.015.
- Gwiggner, M. et al. (2018) 'MicroRNA-31 and MicroRNA-155 Are Overexpressed in Ulcerative Colitis and Regulate IL-13 Signaling by Targeting Interleukin 13 Receptor α -1', *Genes*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 9(2), p. 85. doi: 10.3390/genes9020085.
- Halbwachs-Mecarelli, L. et al. (1995) 'Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool', *FEBS Letters*, 374(1), pp. 29–33. doi: 10.1016/0014-5793(95)01073-N.
- Hammond, S. M. et al. (2001) 'Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 293(5532), pp. 1146–50. doi: 10.1126/science.1064023.
- Hammond, S. M. (2015) 'An overview of microRNAs', *Advanced drug delivery reviews*. NIH Public Access, 87, p. 3. doi: 10.1016/J.ADDR.2015.05.001.
- Hausser, J. und Zavolan, M. (2014) 'Identification and consequences of miRNA-target interactions-beyond repression of gene expression', *Nature Reviews Genetics*, 15(9), pp. 599–612. doi: 10.1038/nrg3765.
- Heijl, C. et al. (2017) 'Long-term patient survival in a Swedish population-based cohort of patients with ANCA-associated vasculitis', *RMD Open*. BMJ Publishing Group, 3(1). doi: 10.1136/rmdopen-2017-000435.
- Hellmich, B. et al. (2021) 'New insights into the epidemiology of ANCA-associated vasculitides in Germany: results from a claims data study', *Rheumatology*. Oxford University Press (OUP). doi: 10.1093/rheumatology/keaa924.
- Hellquist, A. et al. (2007) 'The human GIMAP5 gene has a common polyadenylation polymorphism increasing risk to systemic lupus erythematosus', *Journal of Medical Genetics*. BMJ Publishing Group, 44(5), pp. 314–321. doi: 10.1136/jmg.2006.046185.
- Hilhorst, M. et al. (2015) 'Proteinase 3-ANCA Vasculitis versus Myeloperoxidase-ANCA Vasculitis.', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. American Society of Nephrology, 26(10), pp. 2314–27. doi: 10.1681/ASN.2014090903.
- Hirschberger, S., Hinske, L. C. und Kreth, S. (2018) 'MiRNAs: dynamic regulators of immune cell functions in inflammation and cancer', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 11–21. doi: 10.1016/j.canlet.2018.05.020.
- Ho, H. P. et al. (2017) 'MicroRNA Biosensing with Two-Dimensional Surface Plasmon Resonance Imaging', in *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), pp. 117–127. doi: 10.1007/978-1-4939-6848-0_8.
- Hoffman, Y. et al. (2016) '3'UTR Shortening Potentiates MicroRNA-Based Repression of Pro-differentiation Genes in Proliferating Human Cells', *PLOS Genetics*. Edited by R. B. Gartenhaus. Public Library of Science, 12(2), p. e1005879. doi: 10.1371/journal.pgen.1005879.
- Holle, J. U. et al. (2010) 'Prospective long-term follow-up of patients with localised Wegener's granulomatosis: does it occur as persistent disease stage?', *Annals of the rheumatic diseases*. BMJ Publishing Group Ltd, 69(11), pp. 1934–9. doi: 10.1136/ard.2010.130203.
- Holle, J. U. et al. (2011) 'Improved outcome in 445 patients with Wegener's granulomatosis in a German vasculitis center over four decades', *Arthritis & Rheumatism*. Wiley-Blackwell, 63(1), pp. 257–266. doi: 10.1002/art.27763.
- Huang, H.-Y. et al. (2020) 'miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database.', *Nucleic acids research*, 48(D1), pp. D148–D154. doi: 10.1093/nar/gkz896.

- Hutvagner, G. *et al.* (2001) 'A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA', *Science*, 293(5531), pp. 834–838. doi: 10.1126/science.1062961.
- Jennette, J. C. *et al.* (2013) '2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides', *Arthritis & Rheumatism*. John Wiley & Sons, Ltd, 65(1), pp. 1–11. doi: 10.1002/art.37715.
- Jennette, J. C. und Nachman, P. H. (2017) 'ANCA Glomerulonephritis and Vasculitis.', *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*. American Society of Nephrology, 12(10), pp. 1680–1691. doi: 10.2215/CJN.02500317.
- Jiang, B. *et al.* (2017) 'The role of microRNAs in myopia', *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. Springer Berlin Heidelberg, 255(1), pp. 7–13. doi: 10.1007/s00417-016-3532-6.
- Jiang, S. *et al.* (2018) 'Let-7 Suppresses B Cell Activation through Restricting the Availability of Necessary Nutrients', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 27(2), pp. 393-403.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2017.12.007.
- Jin, H. Y. *et al.* (2015) 'Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution.', *Frontiers in genetics*. Frontiers Media SA, 6, p. 340. doi: 10.3389/fgene.2015.00340.
- Jin, Y. *et al.* (2013) 'Evaluating the microRNA targeting sites by luciferase reporter gene assay.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. NIH Public Access, 936, pp. 117–27. doi: 10.1007/978-1-62703-083-0_10.
- Jones, B. E. *et al.* (2020) 'ANCA autoantigen gene expression highlights neutrophil heterogeneity where expression in normal-density neutrophils correlates with ANCA-induced activation', *Kidney International*. Elsevier B.V., 98(3), pp. 744–757. doi: 10.1016/j.kint.2020.04.037.
- Kettritz, R. (2012) 'How anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies activate neutrophils.', *Clinical and experimental immunology*. Wiley-Blackwell, 169(3), pp. 220–8. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04615.x.
- Kitching, A. R. *et al.* (2020) 'ANCA-associated vasculitis', *Nature Reviews Disease Primers*. Springer US, 6(1). doi: 10.1038/s41572-020-0204-y.
- Korkmaz, B. *et al.* (2016) 'Inhibitors and Antibody Fragments as Potential Anti-Inflammatory Therapeutics Targeting Neutrophil Proteinase 3 in Human Disease', *Pharmacological Reviews*, 668036(July 2016), pp. 603–630.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M. und Griffiths-Jones, S. (2019) 'miRBase: from microRNA sequences to function', *Nucleic Acids Research*. 47(D1), pp. D155–D162. doi: 10.1093/nar/gky1141.
- Kumar, M. *et al.* (2015) 'MicroRNA let-7 modulates the immune response to mycobacterium tuberculosis infection via control of A20, an inhibitor of the NF-κB pathway', *Cell Host and Microbe*. Elsevier Inc., 17(3), pp. 345–356. doi: 10.1016/j.chom.2015.01.007.
- Lagos-Quintana, M. *et al.* (2003) 'New microRNAs from mouse and human.', *RNA (New York, N.Y.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 9(2), pp. 175–9. doi: 10.1261/rna.2146903.
- Lamprecht, P. *et al.* (2018) 'Pathogenetic and Clinical Aspects of Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Vasculitides.', *Frontiers in immunology*. Frontiers Media SA, 9, p. 680. doi: 10.3389/fimmu.2018.00680.
- Leavitt, R. Y. *et al.* (1990) 'The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of wegener's granulomatosis', *Arthritis & Rheumatism*, 33(8), pp. 1101–1107. doi: 10.1002/art.1780330807.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. und Ambros, V. (1993) 'The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.', *Cell*, 75(5), pp. 843–54. doi:

10.1016/0092-8674(93)90529-y.

Lee, Y. et al. (2002) 'MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 21(17), pp. 4663–70. doi: 10.1093/emboj/cdf476.

Lee, Y. et al. (2003) 'The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing', *Nature*, 425(6956), pp. 415–419. doi: 10.1038/nature01957.

Li, Z. et al. (2011) 'IL-23 receptor regulation by Let-7f in human CD4+ memory T cells.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. American Association of Immunologists, 186(11), pp. 6182–90. doi: 10.4049/jimmunol.1000917.

Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Mayr, C. (2017) 'Regulation by 3'-Untranslated Regions', *Annual Review of Genetics*. Annual Reviews, 51(1), pp. 171–194. doi: 10.1146/annurev-genet-120116-024704.

McInnis, E. A. et al. (2015) 'Dysregulation of autoantigen genes in ANCA-associated vasculitis involves alternative transcripts and new protein synthesis.', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. American Society of Nephrology, 26(2), pp. 390–9. doi: 10.1681/ASN.2013101092.

miRBase (2018). Abrufbar unter: <http://www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml> (Accessed: 22 August 2019).

Naqvi, A. R. et al. (2014) 'MicroRNAs responsive to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* LPS modulate expression of genes regulating innate immunity in human macrophages.', *Innate immunity*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 20(5), pp. 540–51. doi: 10.1177/1753425913501914.

O'Connell, R. M. et al. (2010) 'Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 10(2), pp. 111–122. doi: 10.1038/nri2708.

Ohlsson, S. et al. (2005) 'Increased monocyte transcription of the proteinase 3 gene in small vessel vasculitis', *Clinical and Experimental Immunology*, 141(1), pp. 174–182. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02819.x.

Ørom, U. A., Nielsen, F. C. und Lund, A. H. (2008) 'MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation', *Molecular Cell*. Elsevier, 30(4), pp. 460–471. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.001.

Panwar, B., Omenn, G. S. und Guan, Y. (2017) 'miRmine: A Database of Human miRNA Expression Profiles', *Bioinformatics*. 33(10), p. btx019. doi: 10.1093/bioinformatics/btx019.

Paraskevopoulou, M. D. et al. (2013) 'DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows.', *Nucleic acids research*, 41, pp. W169-73. doi: 10.1093/nar/gkt393.

Pearce, F. A. et al. (2017) 'Global ethnic and geographic differences in the clinical presentations of anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis', *Rheumatology*. 56(11), pp. 1962–1969. doi: 10.1093/rheumatology/kex293.

Pham, C. T. N. (2006) 'Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 6(7), pp. 541–550. doi: 10.1038/nri1841.

Pieters, K. et al. (2004) 'The - 564 A/G polymorphism in the promoter region of the proteinase 3 gene associated with Wegener's granulomatosis does not increase the promoter activity.', *Clinical and experimental immunology*, 138(2), pp. 266–270. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02608.x.

Rehmsmeier, M. et al. (2004) 'Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes.',

RNA (New York, N.Y.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10(10), pp. 1507–17. doi: 10.1261/rna.5248604.

Reinhold-Keller, E. et al. (2005) 'Stable incidence of primary systemic vasculitides over five years: Results from the German vasculitis register', *Arthritis & Rheumatism*. John Wiley & Sons, Ltd, 53(1), pp. 93–99. doi: 10.1002/art.20928.

Roehle, A. et al. (2008) 'MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas', *British Journal of Haematology*. John Wiley & Sons, Ltd, 142(5), pp. 732–744. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07237.x.

Ryu, S. et al. (2013) 'Suppression of miRNA-708 by polycomb group promotes metastases by calcium-induced cell migration.', *Cancer cell*. Elsevier, 23(1), pp. 63–76. doi: 10.1016/j.ccr.2012.11.019.

Sætrom, P. et al. (2007) 'Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity', *Nucleic Acids Research*. 35(7), pp. 2333–2342. doi: 10.1093/nar/gkm133.

Schaefer, A. et al. (2009) 'Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma', *International Journal of Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 126(5). doi: 10.1002/ijc.24827.

Schinke, S. et al. (2013) 'SAT0019 Disease-associated micro-RNA profiles in granulomatosis with polyangiitis nasal tissue indicate a regulatory network targeting pathophysiological processes', *Annals of the Rheumatic Diseases*. BMJ Publishing Group Ltd, 71(Suppl 3), pp. 477.2-477. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-eular.2967.

Scullion, K. M. et al. (2021) 'Circulating argonaute-bound microRNA-126 reports vascular dysfunction and treatment response in acute and chronic kidney disease', *iScience*. Elsevier Inc., 24(1). doi: 10.1016/j.isci.2020.101937.

Selbach, M. et al. (2008) 'Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs', *Nature*, 455(7209), pp. 58–63. doi: 10.1038/nature07228.

Shen, N. et al. (2012) 'MicroRNAs—novel regulators of systemic lupus erythematosus pathogenesis', *Nature Reviews Rheumatology*, 8(12), pp. 701–709. doi: 10.1038/nrrheum.2012.142.

Skoglund, C. et al. (2015) 'Circulating microRNA expression pattern separates patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis from healthy controls.', *Clinical and experimental rheumatology*, 33(2 Suppl 89), p. S-64-71.

Sun, S. nan et al. (2019) 'Relevance function of microRNA-708 in the pathogenesis of cancer', *Cellular Signalling*. Elsevier, 63(May), p. 109390. doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109390.

Svendsen, J. B. et al. (2016) 'MicroRNA-941 Expression in Polymorphonuclear Granulocytes Is Not Related to Granulomatosis with Polyangiitis.', *PloS one*. Public Library of Science, 11(10), p. e0164985. doi: 10.1371/journal.pone.0164985.

Svoboda, P. (2015) 'A toolbox for miRNA analysis', *FEBS Letters*. John Wiley & Sons, Ltd, 589(14), pp. 1694–1701. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.054.

Tarang, S. und Weston, M. D. (2014) 'Macros in microRNA target identification: A comparative analysis of in silico, in vitro, and in vivo approaches to microRNA target identification', *RNA Biology*, 11(4), pp. 324–333. doi: 10.4161/rna.28649.

Täubel, J. et al. (2021) 'Novel antisense therapy targeting microRNA-132 in patients with heart failure: results of a first-in-human Phase 1b randomized, double-blind, placebo-controlled study', *European Heart Journal*. Oxford University Press (OUP), 42(2), pp. 178–188. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa898.

Tokar, T. et al. (2018) 'mirDIP 4.1—integrative database of human microRNA target predictions', *Nucleic Acids Research*. 46(D1), pp. D360–D370. doi: 10.1093/nar/gkx1144.

Tsai, W.-C. et al. (2009) 'MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma', *Hepatology*, 49(5), pp. 1571–1582. doi:

10.1002/hep.22806.

Tsou, P.-S. und Sawalha, A. H. (2017) 'Unfolding the Pathogenesis of Scleroderma through Genomics and Epigenomics', *Journal of autoimmunity*. NIH Public Access, 83, p. 73. doi: 10.1016/J.JAUT.2017.05.004.

Vahidi Manesh, P. et al. (2019) 'Downregulation of miR-542-3p Contributes to Apoptosis Resistance in Dermal Fibroblasts from Systemic Sclerosis Patients via Survivin Overexpression', *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 18(2), pp. 173–181. doi: 10.18502/ijaa.v18i2.920.

Vejnar, C. E. und Zdobnov, E. M. (2012) 'miRmap: Comprehensive prediction of microRNA target repression strength', *Nucleic Acids Research*. 40(22), pp. 11673–11683. doi: 10.1093/nar/gks901.

Vicente, R. et al. (2016) 'Deregulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic diseases', *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group, 12(4), pp. 211–220. doi: 10.1038/nrrheum.2015.162.

Walton, E. W. (1958) 'Giant-cell granuloma of the respiratory tract (Wegener's granulomatosis).', *British medical journal*. BMJ Publishing Group, 2(5091), pp. 265–70.

Wang, E. T. et al. (2008) 'Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes', *Nature*, 456(7221), pp. 470–476. doi: 10.1038/nature07509.

Wang, X.-S. et al. (2012) 'MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia.', *Blood*. American Society of Hematology, 119(21), pp. 4992–5004. doi: 10.1182/blood-2011-10-385716.

Wang, Y. et al. (2013) 'MicroRNA let-7a Inhibits the Proliferation and Invasion of Nonsmall Cell Lung Cancer Cell Line 95D by Regulating K-Ras and HMGA2 Gene Expression', *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 28(2), pp. 131–137. doi: 10.1089/cbr.2012.1307.

Watts, R. A. et al. (2001) 'Geoepidemiology of systemic vasculitis: comparison of the incidence in two regions of Europe', *Annals of the Rheumatic Diseases*. BMJ Publishing Group Ltd, 60(2), pp. 170–172. doi: 10.1136/ARD.60.2.170.

Weber, J. A. et al. (2010) 'The microRNA spectrum in 12 body fluids', *Clinical Chemistry. Clin Chem*, 56(11), pp. 1733–1741. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405.

Wegener, F. (1939) 'Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren.', *Beitr. path. Anat.*, 102, pp. 36–68.

Weitzel, R. P. et al. (2009) 'MicroRNA 184 regulates expression of NFAT1 in umbilical cord blood CD4 + T cells', *Blood*. Blood, 113(26), pp. 6648–6657. doi: 10.1182/blood-2008-09-181156.

Wilde, B. et al. (2012) 'Th17 expansion in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): the role of disease activity, immune regulation and therapy', *Arthritis Research and Therapy. Arthritis Res Ther*, 14(5). doi: 10.1186/ar4066.

Wu, J. et al. (2018) 'miR-708-5p promotes fibroblast–like synoviocytes' cell apoptosis and ameliorates rheumatoid arthritis by inhibition of Wnt3a/β-catenin pathway', *Drug Design, Development and Therapy*. Dove Press, Volume 12, pp. 3439–3447. doi: 10.2147/DDDT.S177128.

Wuttge, D. M. et al. (2015) 'Specific autoantibody profiles and disease subgroups correlate with circulating micro-RNA in systemic sclerosis', *Rheumatology*. 54(11), pp. 2100–2107. doi: 10.1093/rheumatology/kev234.

Yang, J. J. et al. (2004) 'Circumvention of normal constraints on granule protein gene expression in peripheral blood neutrophils and monocytes of patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 15(8), pp. 2103–14. doi: 10.1097/01.ASN.0000135058.46193.72.

Yi, R. et al. (2003) 'Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short

hairpin RNAs', *Genes & Development*, 17(24), pp. 3011–3016. doi: 10.1101/gad.1158803.

Zhen, Y. et al. (2013) 'Tumor suppressor PDCD4 modulates miR-184-mediated direct suppression of C-MYC and BCL2 blocking cell growth and survival in nasopharyngeal carcinoma', *Cell Death and Disease*. Cell Death Dis, 4(10). doi: 10.1038/cddis.2013.376.

Anhang

I Ergebnisse der *in silico*-Analyse

Tabelle 22: Unidirektionale mirDIP Suche zu PRTN3 (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP>, letzter Zugriff 17.01.2021). Gefunden wurden 7 miRNAs mit hoher Bindungswahrscheinlichkeit an die Proteinase 3, sowie 853 miRNAs mit mittlerer Bindungswahrscheinlichkeit. Dargestellt sind die 7 miRNAs mit hoher Bindungswahrscheinlichkeit sowie die miRNAs, die eine mittlere Bindungswahrscheinlichkeit aufweisen und gleichzeitig von Schinke *et al.*, 2013 als überexprimiert beschrieben wurden.

miRNA	Bindungswahrscheinlichkeit
hsa-miR-558	hoch
hsa-miR-122-5p	hoch
hsa-miR-615-5p	hoch
hsa-miR-484	hoch
hsa-miR-574-5p	hoch
hsa-miR-128-3p	hoch
hsa-miR-92a-2-5p	hoch
hsa-miR-214-5p	mittel
hsa-miR-335-5p	mittel
hsa-miR-375	mittel
hsa-miR-26b-5p	mittel
hsa-miR-140-5p	mittel
hsa-miR-1228-3p	mittel
hsa-miR-532-3p	mittel
hsa-miR-572	mittel
hsa-miR-1825	mittel
hsa-miR-30b-5p	mittel
hsa-let-7f-5p	mittel
hsa-miR-10b-5p	mittel
hsa-miR-708-5p	mittel
hsa-miR-31-5p	mittel
hsa-miR-184	mittel

Tabelle 23: Unidirektionale mirDIP Suche zu den drei miRNAs 184, 708-5p und let-7f-5p (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP>, letzter Zugriff 17.01.2021). Dargestellt sind jeweils die 10 Ziel-mRNAs mit den höchsten vorhergesagten Bindungswahrscheinlichkeiten.

hsa-miR-184	hsa-miR-708-5p	hsa-let-7f-5p
SF1	GPM6A	BZW1
AGO2	FOXJ3	COL1A2
PLPP3	ETF1	HMGA2

NUS1	RAP1B	DUSP1
HAND2	NFE2L2	ARID3B
SIDT2	KIAA0355	MAP4K3
EPB41L5	EN2	BACH1
FBXO28	GON4L	LRIG2
ZIC4	HNRNPK	EIF4G2
PRKCB	WIPF2	SMARCAD1

II Ergebnisse der PR3-qPCR

Tabelle 24: Ct-Werte, die für die Berechnung der relativen PR3-mRNA-Menge in *HeLa*-Zellen verwendet wurden.

	18S-rRNA-Primer	PR3-Primer
Wasser (NTC)	37,0	35,2
<i>HL60</i> -cDNA	11,1	19,2
<i>HeLa</i> -cDNA	15,7	35,1

III Zusätzliche Ergebnisse der Luziferaseassays

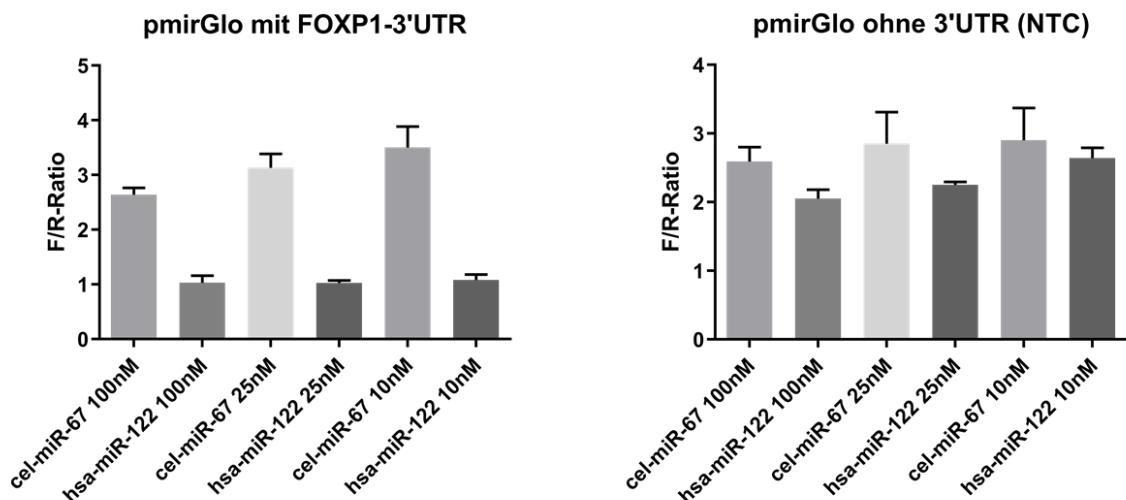


Abbildung 14: Vergleich verschiedener miRNA-*mimic* Konzentrationen. Die miRNA-*mimic* hsa-miR-122 und die Negativkontrolle cel-miR-67 wurden in den Konzentrationen 100 nM, 25 nM und 10 nM zusammen mit dem miR-122 Ziel FOXP1-3'UTR oder ohne Ziel (NTC) in *HeLa*-Zellen transfiziert. Mit abnehmender Konzentration bleibt die *Firefly/Renilla*-Ratio (F/R-Ratio) von hsa-miR-122 konstant. Der Unterschied zur Negativkontrolle cel-miR-122 nimmt jedoch zu, wodurch der Effekt bei niedrigeren Konzentrationen größer ist. In der NTC Kontrolle steigt die F/R-Ratio mit abnehmender miRNA-*mimic* Konzentration leicht an. Dies könnte ein Zeichen für Toxizität der miRNA-*mimics* sein. Niedrige Konzentrationen sind daher zu bevorzugen.

Tabelle 25: Luziferaseaktivitäten und p-Werte aller miRNA-*mimics* cotransfiziert mit der PR3-3‘UTR

Name der 3‘UTR	miRNA-mimic	relative Luziferase-aktivität ohne 3‘UTR (NTC)	relative Luziferase-aktivität mit 3‘UTR	Signifikanzwert p	Zusatz-information
PR3	MOC	1,041	1,046	0,919999	Kein miRNA- <i>mimic</i>
AKT2	cel-miR-67	1,000	1,000		Normierung Positivkontrolle
AKT2	Hsa-miR-184	0,9226	0,6936	0,000012	Positivkontrolle
PR3	cel-miR-67	1,000	1,000		Normierung
PR3	Hsa-miR-1271	0,9397	0,9169	0,648698	
PR3	Hsa-miR-214-5P	0,9194	0,8754	0,380802	
PR3	Hsa-miR-148a	1,042	0,9988	0,392505	
PR3	Hsa-miR-335	1,004	1,036	0,517329	
PR3	Hsa-miR-375	0,9519	0,9776	0,609444	
PR3	Hsa-miR-193b	0,9993	0,9609	0,444464	
PR3	Hsa-miR-26b	0,9824	0,9665	0,750646	
PR3	Hsa-miR-140-5P	1,000	0,9949	0,917573	
PR3	Hsa-miR-1228	1,036	1,011	0,611581	
PR3	Hsa-miR-532-3P	1,049	1,019	0,558581	
PR3	Hsa-miR-572	0,8848	0,9436	0,242473	
PR3	Hsa-miR-1825	0,9042	0,8726	0,530038	
PR3	Hsa-miR-30b	1,007	0,9771	0,549052	
PR3	Hsa-miR-29-b2	0,9414	0,9356	0,907901	
PR3	Hsa-let-7f	0,9957	0,8732	0,015820	Signifikant
PR3	Hsa-miR-10b	0,9518	0,9343	0,726493	
PR3	Hsa-miR-708	0,9524	1,021	0,174598	
PR3	Hsa-miR-210	1,011	0,9777	0,511969	
PR3	Hsa-miR-31	1,114	1,120	0,906728	
PR3	Hsa-miR-205	0,9944	0,9873	0,887070	
PR3	Hsa-miR-184	0,9807	0,8089	0,000010	Signifikant
PR3	Hsa-miR-634	0,9851	1,001	0,753549	

Tabelle 26: Luziferaseaktivitäten und p-Werte aller miRNA-mimics cotransfiziert mit der alternativen PR3-3'UTR

Name der 3'UTR	miRNA-mimic	relative Luziferase-aktivität ohne 3'UTR (NTC)	relative Luziferase-aktivität mit 3'UTR	Signifikanzwert p	Zusatz-information
PR3 alternativ	MOC	1,129	1,068	0,198321	Kein miRNA-mimic
AKT2	cel-miR-67	1,000	1,000		Normierung Positiv-kontrolle
AKT2	Hsa-miR-184	0,9530	0,6610	<0,000001	Positiv-kontrolle
PR3 alternativ	cel-miR-67	1,000	1,000		Normierung
PR3 alternativ	Hsa-miR-1271	0,8196	0,8310	0,807383	
PR3 alternativ	Hsa-miR-214-5P	0,8391	0,7946	0,346763	
PR3 alternativ	Hsa-miR-148a	0,9724	0,9643	0,862953	
PR3 alternativ	Hsa-miR-335	0,9405	0,9768	0,441722	
PR3 alternativ	Hsa-miR-375	0,9091	0,8897	0,680729	
PR3 alternativ	Hsa-miR-193b	0,9534	0,9004	0,262791	
PR3 alternativ	Hsa-miR-26b	0,9472	0,9526	0,908050	
PR3 alternativ	Hsa-miR-140-5P	0,9491	0,9037	0,336045	
PR3 alternativ	Hsa-miR-1228	0,9857	0,9680	0,706221	
PR3 alternativ	Hsa-miR-532-3P	0,9461	0,9981	0,271103	
PR3 alternativ	Hsa-miR-572	0,7827	0,8647	0,084484	
PR3 alternativ	Hsa-miR-1825	0,8792	0,8890	0,836186	
PR3 alternativ	Hsa-miR-30b	1,058	0,9770	0,086039	
PR3 alternativ	Hsa-miR-29-b2	0,8722	0,9058	0,476902	
PR3 alternativ	Hsa-let-7f	0,9919	0,7025	<0,000001	Signifikant
PR3 alternativ	Hsa-miR-10b	0,9019	0,9293	0,560673	
PR3 alternativ	Hsa-miR-708	1,010	0,7716	0,000002	Signifikant
PR3 alternativ	Hsa-miR-210	0,9492	0,9618	0,788853	
PR3 alternativ	Hsa-miR-31	1,140	1,083	0,231363	
PR3 alternativ	Hsa-miR-205	0,9126	0,9190	0,891687	
PR3 alternativ	Hsa-miR-184	0,9530	0,9097	0,359213	

Danksagung

Ich danke meiner Betreuerin Dr. Susanne Schinke dafür, dass Sie mir diese Dissertation ermöglicht und mich bei dieser Arbeit hervorragend unterstützt hat. Sie ließ mir so viele Freiheiten zur Gestaltung der Experimente wie ich brauchte und war trotzdem immer für mich erreichbar wenn ich Fragen hatte oder nicht weiter wusste. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern im Labor, mit denen das Arbeiten großen Spaß gemacht hat. Dort besonders zu erwähnen ist Dr. Antje Müller, die mir als Laborleitung viel Vertrauen schenkte und die mich und das Projekt zu jeder Zeit gefördert hat. Weiterhin möchte ich meinem guten Freund Jan Souverein für das Korrekturlesen und meiner Frau Anna Reichard für Korrekturen, sowie die viele Geduld und die Freiräume danken, die sie mir zum Schreiben verschafft hat. Meinen Eltern danke ich für die jahrelange Unterstützung und Geduld und versichere ihnen hiermit, dass ich vorerst kein weiteres Studium anzuschließen plane. Zum Schluss danke ich meinem Doktorvater Prof. Peter Lamprecht für die Korrekturen und das Feedback zu meiner Arbeit. Die Anfertigung dieser Dissertation in der Rheumatologie der Uni Lübeck hat mir große Freude bereitet und ohne die erwähnten Personen wäre sie vermutlich so nie entstanden. Danke!

Erklärung

Ich versichere an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Lübeck, den

(Nick Reichard)