

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

## **Bedeutung der micro-RNA 93 im Krankheitsbild der Sepsis**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Julia Sofie Samweber  
aus München

2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatterin:	Prof. Dr. Dr. Simone Kreth
Mitberichterstatter:	PD Dr. Johannes Tschöp
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	05.12.2019

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Julia Samweber, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Bedeutung der micro-RNA 93 im Krankheitsbild der Sepsis“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, der 05.12.2019

---

Julia Samweber

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	4
1 Einleitung .....	6
1.1 Epidemiologische und ökonomische Aspekte der Sepsis.....	6
1.2 Definition und Pathophysiologie der Sepsis .....	6
1.3 Biogenese und Funktion von micro-RNAs.....	9
1.4 MiRNAs im Rahmen des Krankheitsbilds der Sepsis .....	11
1.5 Zielsetzung .....	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Materialien .....	14
2.1.1 Geräte.....	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	15
2.1.3 Assays und Kits .....	16
2.1.4 Reagenzien .....	17
2.1.5 Selbsthergestellte Gele, Puffer und Medien .....	19
2.1.6 Primer.....	22
2.1.7 Software .....	24
2.1.8 Proben .....	24
2.2 Methoden .....	25
2.2.1 Zellkulturen .....	25
2.2.2 Gewinnung von primären T-Zellen .....	25
2.2.3 Transfektion durch Elektroporation mittels Neon™ Transfection System.....	27
2.2.4 RNA Isolation mittels RNAqueous®-Phenol-free total RNA Isolation Kit .....	28
2.2.5 Umschrift in cDNA .....	29
2.2.6 Real-time quantitative PCR mit den Light Cycler® 480 Multiwell Plates von Roche Diagnostics GmbH .....	29
2.2.7 Klonierung eines Reporterplasmids .....	32
2.2.8 Gerichtete Mutagenese der premiR-93 Bindestellen im STK17B- Reporterplasmid .....	39
2.2.9 Luciferase-Messung mittels Dual-Glo™ Luciferase Assay System .....	40
2.2.10 Proteinbestimmung.....	41
2.2.11 Arbeiten mit dem Attune ® Acoustic Focusing Cytometer .....	43
2.3 Statistik.....	44
3 Ergebnisse .....	46

3.1	Die Expression von miR-93 ist in T-Zellen von Sepsispatienten gesteigert .....	46
3.2	<i>In silico</i> -Analyse zeigt STK17B als potentielles Zielgen der miR-93 .....	47
3.3	Transfektion von premiR-93 in CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen reduziert die <i>STK17B</i> mRNA-Expression .....	49
3.4	Transfektion von premiR-93 führt zu einer verminderten STK17B-Proteinexpression in primären CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen .....	50
3.5	Regulation der STK17B wird über direkte Bindung der miR-93 an Bindestellen im 3'UTR der <i>STK17B</i> mRNA vermittelt .....	51
3.6	<i>STK17B</i> wirkt in humanen CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen proapoptotisch .....	56
4	Diskussion .....	59
5	Zusammenfassung .....	63
6	Literaturverzeichnis .....	65
7	Abbildungsverzeichnis .....	72
8	Tabellenverzeichnis .....	74
9	Danksagung .....	75

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologische und ökonomische Aspekte der Sepsis

Trotz der vielfältigen Möglichkeiten der modernen Medizin ist die Sepsis noch immer eine häufige, oft tödlich verlaufende Erkrankung [2, 28, 50, 51]. Laut einer Studie des Kompetenznetzwerks Sepsis (SepNet) liegt auf deutschen Intensivstationen eine Prävalenz der Sepsis von 12 % (79 000 Patienten/Jahr) und der schweren Sepsis bzw. des septischen Schocks von 11 % (75 000 Patienten/Jahr) mit einer 90-Tage-Sterblichkeit bei schwerer Sepsis bzw. septischem Schock von 54 % vor [28]. Damit ist die Sepsis mit 60 000 Toten/Jahr die dritthäufigste Todesursache in Deutschland [28]. Die dabei direkt in der Klinik entstehenden Kosten belaufen sich auf 1,77 Mrd. EUR/ Jahr [28]. Bei vielen Patienten führen bleibende funktionelle Einschränkungen, wie die Critical Illness Polyneuropathie (CIP) und die Critical Illness Myopathie (CIM) zu anhaltendem Produktivitätsverlust, sodass im Verlauf weitere Kosten für die Gesellschaft entstehen [28, 30, 50, 62].

Somit ist von allgemeinem Interesse, neue Behandlungsansätze für die Sepsis zu finden.

## 1.2 Definition und Pathophysiologie der Sepsis

Unter Sepsis wurde seit 1991 ein systemisches inflammatorisches Responsesyndrome (SIRS), welches durch Infektion hervorgerufen wurde, verstanden [23]. Zudem wurde weiter in schwere Sepsis (mit Organdysfunktion) [62] und septischen Schock (Blutdruck unter adäquater Therapie mindestens eine Stunde unter den Grenzwerten) klassifiziert [9, 30, 62].

Anfang 2016 wurde die „Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock“, kurz Sepsis-3 publiziert [65]. Die bisher gültige Klassifikation wurde als überholt angesehen, da diese zu unspezifisch sei. Sepsis wird nun als lebensbedrohliche Organdysfunktion, hervorgerufen durch eine Fehlregulation der Entzündungsreaktion, als Folge einer Infektion angesehen [65]. Die Sepsis stellt dabei weniger eine Krankheit per se, denn vielmehr einen Symptomkomplex bei vermuteter Infektion dar.

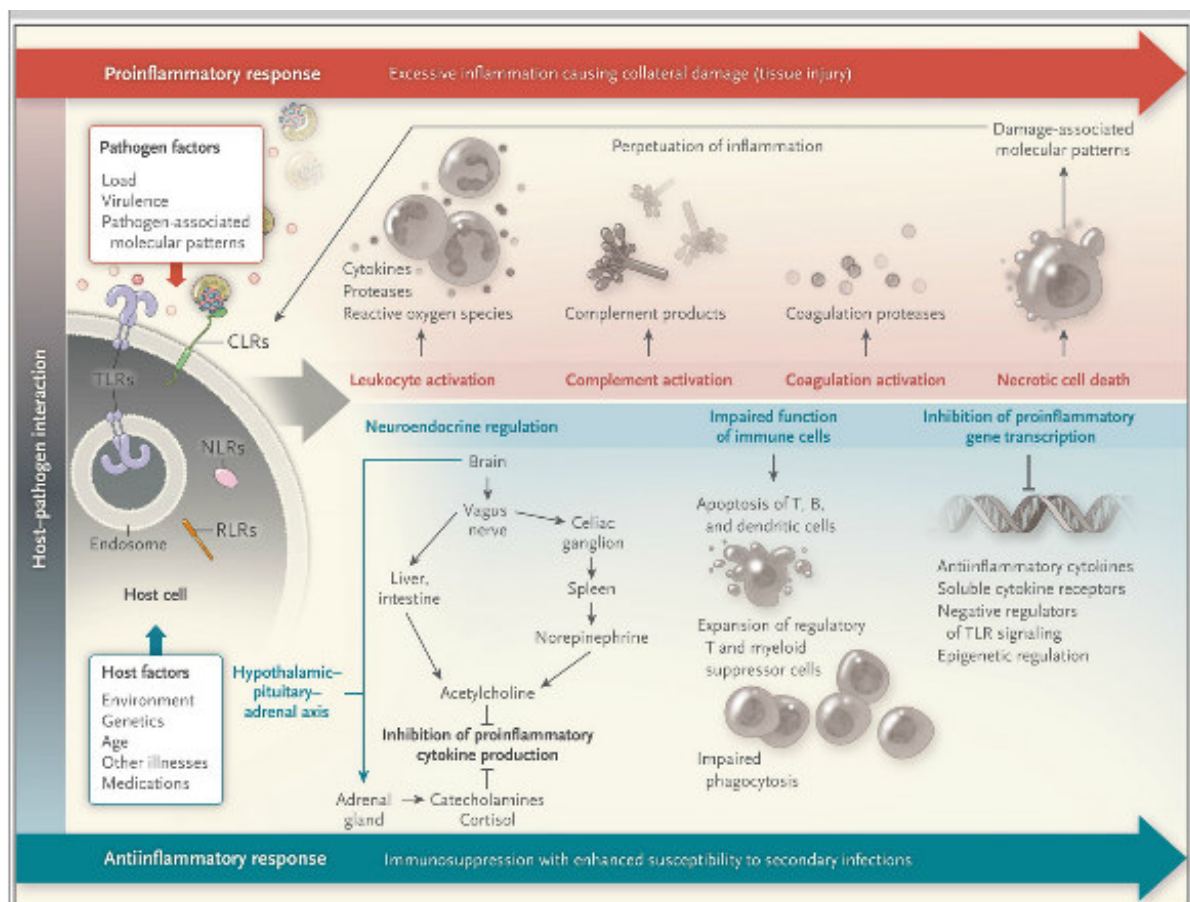
Zur Klassifikation wurden der SOFA-Score (kurz für Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment Score) sowie die vereinfachten quickSOFA (qSOFA) Kriterien eingeführt, von denen mindestens 2 erfüllt sein müssen: Atemfrequenz  $\geq 22/\text{min}$ , veränderter Bewusstseinszustand, syst. Blutdruck  $\leq 100 \text{ mmHg}$ .

Zur Berechnung des SOFA-Scores werden Parameter stellvertretend für verschiedene Organsysteme herangezogen. So werden Atmung (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> gleich dem Sauerstoffpartialdruck im Blut bezogen auf den Anteil von Sauerstoff in der eingeatmeten Luft), Gerinnung (Thrombozytenzahl), Leberfunktion (Bilirubinwert), Herz-Kreislaufsystem (mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)), das zentrale Nervensystem (Glasgow Coma Scale)

und Nierenfunktion (Serumkreatinin, Urinausscheidung) betrachtet <sup>[65]</sup>. Je Organsystem werden 0 bis 4 Punkte vergeben. Aus einer stärkeren Einschränkung des jeweiligen Organsystems folgt ein höherer Punktwert. Die Summe der Punktwerte aller Organsysteme ergibt den SOFA-Score. Dieser kann mit einer wahrscheinlichen Mortalität korreliert werden <sup>[65]</sup>.

Die Sepsis wird weiter unterteilt in Sepsis und schwere Sepsis. Die schwere Sepsis beschreibt definitionsgemäß die Sepsispatienten, bei denen zirkulatorische, zelluläre oder metabolische Veränderungen vorliegen, welche schwerwiegend genug sind, um die Mortalität zu erhöhen. Klinisch definiert sich die schwere Sepsis durch die Erfordernis einer Katecholamintherapie, um den MAP über 65 mmHg zu halten sowie eine Lactaterhöhung von über 2 mmol/l unter adäquater Flüssigkeitstherapie bei vorliegender Sepsis <sup>[65]</sup>.

Die Pathophysiologie der Sepsis ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Führt eine Infektion normalerweise zu einer lokalisierten Immunreaktion, so ist bei der Sepsis eine generalisierte Fehlregulation der Entzündungsreaktion mit Gewebeerstörung und gestörter Koagulation vorherrschend <sup>[31]</sup>. Einen Überblick über ablaufende Prozesse zeigt Abbildung 1.1.



**Abbildung 1.1:** Wirtsantwort auf Pathogene bei schwerer Sepsis <sup>[3]</sup>

Wurde zunächst davon ausgegangen, dass eine frühe Phase mit überschießender, ineffektiver Immunreaktion von einer späten, durch Immunsuppression charakterisierten Phase unterschieden werden kann [4, 31, 61], so ist inzwischen belegt, dass pro- und anti-inflammatorische Immunantwort von Anfang an parallel ablaufen [3, 24].

An der hyperinflammatorischen Reaktion bei Sepsis sind sowohl die angeborene, als auch die adaptive Immunantwort beteiligt. Das angeborene Immunsystem ist durch Bindung von Erregerbestandteilen, auch pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) genannt, an Signalerkennungsstrukturen körpereigener Zellen, sogenannte Pattern-Recognition Receptors (PRR), beteiligt [38, 49]. Nach Bindung wird durch nachgeschaltete Signalkaskaden ein unkontrollierter „Sturm“ pro-inflammatorischer Zytokine initiiert [17, 61] und die pro-inflammatorische adaptive Immunantwort aktiviert [38]. Die freigesetzten Zytokine können jedoch auch zu Endothelschädigung führen. Aus aktivierten Endothelzellen folgt eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid, welches zu Vasodilatation und erhöhter Gefäßpermeabilität sowie schließlich septischem Schock führt. Zudem wird Gewebethromboplastin freigesetzt, welches über Aktivierung von Thrombin die Blutgerinnung induziert. Hyperkoagulabilität kann auch durch reduzierte Antikoagulation bei vermindertem Protein C, oder verminderter Fibrinolyse bei vermehrtem Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-1) beeinträchtigt sein [4, 31, 61]. In maximaler Ausprägung führt die Störung der Gerinnung zur disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) [59].

Gegenspieler der hyperinflammatorischen Reaktionen sind die immunsuppressiven Prozesse, welche zur septischen Immunsuppression führen. Hierdurch kommt es vermehrt zu Superinfektionen [4, 31]. Bereits in frühen Phasen der Sepsis sind vermehrt regulatorische T-Suppressorzellen und myeloische Suppressorzellen zu beobachten [11, 31]. Die immunsuppressive Reaktion gipfelt im sogenannten compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) [4, 8, 72] mit „cutaneous anergy“, Hypothermie, Leukopenie, Infektanfälligkeit und der Unfähigkeit zur Infektbekämpfung [72].

Molekular betrachtet besteht eine Abnahme von pro-inflammatorischen T-Helfer-Zellen Typ 1, eine Zunahme von eher anti-inflammatorischen Typ 2 T-Helfer-Zellen (Th2) [31, 59, 61], eine Modifikation der Zytokinausschüttung (z.B. IL-6, IFN- $\gamma$  [11]) sowie eine Lymphozytendysfunktion mit vermehrter Apoptose von T-Lymphozyten [25, 31, 61, 72].

Unter anderem Hotchkiss et al. zeigen seit 1999 den bedeutenden Beitrag der Apoptose von Lymphozyten zur immunologischen Dysfunktion bei Sepsis und im septischen Schock [24-27]. Wie in Boomer et al. 2012 erläutert, zeigt sich bei Sepsis eine Zellerschöpfung (u.a. verminderte Zytokinausschüttung aus T-Zellen, verminderte Proliferation).



Dem liegt mitunter eine Alteration der Oberflächenrezeptoren von T-Lymphozyten zugrunde. So wurde eine vermehrte Expression von T-Cell Immunoglobulin and Mucin-Domain Containing-3 (TIM-3), Lymphocyte Activation Gene 3 Protein (LAG3), CD69, Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1, inhibiert die T-Zellproliferation) sowie eine verminderte Expression von IL-7R auf der Oberfläche bei T-Lymphozyten von Patienten mit Sepsis nachgewiesen. Die Überexpression von PD-1 bei Sepsis korreliert mit einem schlechteren Outcome<sup>[10, 11]</sup>.

Boomer et al. wiesen 2014 eine vermehrte Apoptose von CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten sowohl im Mausmodell als auch bei Patienten mit schwerer Sepsis nach. Es konnte zudem gezeigt werden, dass bisher unbekannt, im Plasma von Patienten mit Sepsis gelöste Stoffe, die Apoptose von T-Lymphozyten induzieren. Auch postmortem Studien zeigen bei Sepsis eine gesteigerte Anfälligkeit von T-Lymphozyten für Apoptose durch die Alterationen ihrer Oberflächenrezeptoren (verminderte Expression von CD28 und B7). Die bei Sepsis überexprimierten Oberflächenrezeptoren Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA-4) und der B und T Lymphocyte Attenuator (BTLA), inhibieren zusätzlich die T-Zellfunktion<sup>[10]</sup>. So konzentrieren sich aktuellen Studien verstärkt auf die T-Zell-vermittelten Vorgänge des adaptiven Immunsystems<sup>[11, 59, 69]</sup>. Neue Studien vermuten dabei neben der rezeptorassoziierten, auch eine metabolische Induktion der Apoptose (durch Beeinträchtigung des Fettsäurestoffwechsels und der Glykolyse sowie konsekutiv gestörter Energiebereitstellung)<sup>[58]</sup>.

Die Apoptose von Lymphozyten führt zu einer deutlichen, anhaltenden Lymphopenie, welche mit einem schlechteren Überleben assoziiert ist<sup>[26, 35]</sup>. Nicht zuletzt das Ausbleiben positiver Effekte von anti-inflammatorischen Therapien auf das Überleben führte dazu, dass der immunsuppressiven Phase der Sepsis mehr Aufmerksamkeit gewidmet wurde<sup>[38]</sup>.

Insgesamt zeigt sich ein komplexes, dynamisches Krankheitsbild mit großer Heterogenität<sup>[4]</sup>. Zusammengenommen sind Organdysfunktionen bis hin zu Multiorganversagen und Tod die Folge. Vor diesem Hintergrund wird klar, dass es von allgemeinem Interesse ist, neue Behandlungsansätze für die Sepsis zu finden. Hierbei treten zunehmend auch molekulare Ansatzpunkte in den Fokus der Forschung, um Ergänzungen zur herkömmlichen supportiven Therapien zu finden.

### **1.3 Biogenese und Funktion von micro-RNAs**

Um neue diagnostische und therapeutische Optionen zu evaluieren, verfolgt die aktuelle Forschung daher zunehmend molekulare Ansatzpunkte. Zu den posttranskriptionellen Mechanismen der Genregulation gehört die RNA-Interferenz. Dabei treten endogen

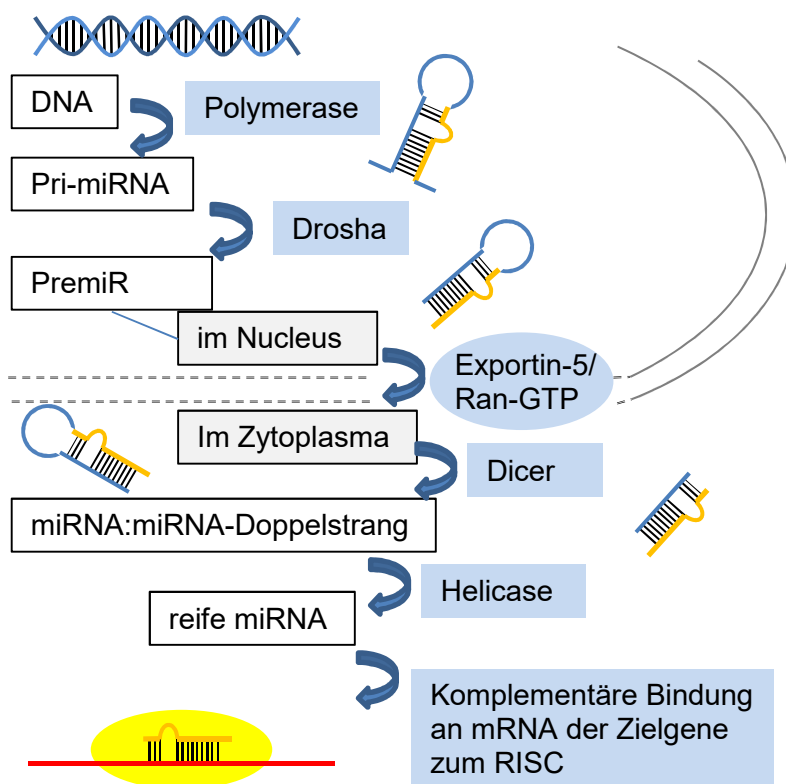
gebildete kurze RNA-Moleküle mit mRNA in Wechselwirkung. Solche kurzen RNA-Moleküle können micro-RNAs (miRNAs) sein.

Die vor einigen Jahren entdeckten <sup>[36]</sup> miRNAs sind kurze, ca. 22 Nukleotide lange Moleküle <sup>[66]</sup>, die selbst nicht für Proteine codieren, jedoch posttranskriptionell verschiedenste Signalwege durch RNA-Interferenz regulieren <sup>[18]</sup>. Sie modulieren dadurch die Expression pro- und antiinflammatorischer Gene und spielen somit bei diversen immunologischen Prozessen eine wesentliche Rolle <sup>[54]</sup>. MiRNAs werden bei miRBase aufgeführt <sup>[21]</sup>.

Sie werden endogen gebildet und gehen aus ca. 70 Nukleotide langen pre-microRNAs (premiRs) hervor <sup>[5, 13, 22, 33]</sup>. DNA wird zunächst mittels der *RNA-Polymerase II (Pol II)* in Primär-microRNA (pri-miRNA) transkribiert. Daraus schneidet die Endonuclease *Drosha* die premiR aus <sup>[37]</sup>. Sie liegt durch unvollständige, komplementäre Basenbindung als Haarnadelschleife weitgehend doppelsträngig im Nucleus vor.

Mittels dem Ran-GTP-abhängigen Export-Rezeptor *Exportin-5* wird die premiR ins Zytoplasma exportiert <sup>[42, 74]</sup>.

Im Zytoplasma wird die premiR durch die Endonuclease *Dicer* erneut geschnitten. Sie liegt danach in einem Sense:Anti-Sense-miRNA:miRNA-Doppelstrang vor <sup>[7]</sup>. Der Doppelstrang wird durch eine Helicase in miRNA-Einzelstränge gespalten. MiRNA-Einzelstränge liegen nun im Zytoplasma vor.



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der miRNA Entstehung** (modifiziert nach <sup>[5]</sup>)

Der Sense-miRNA-Einzelstrang wird Bestandteil des RNA-induced silencing complex (RISC). Weitere Bestandteilen des RISC stellen mitunter das Protein Argonaute 2 und das „trans-activation-responsive RNA binding protein“ (TRBP) dar <sup>[13, 60]</sup>.

Über den Sense-miRNA-Einzelstrang bindet der RISC durch partielle Komplementarität an die 3'untranslatierte Region (3'UTR) von mRNA. Lediglich im Bereich der sogenannten „seed sequence“, welche Nukleotid 2-7 der miRNA darstellt <sup>[39]</sup>, muss eine vollständige Komplementarität zwischen der miRNA und der Ziel-mRNA vorliegen.

Der RISC unterbindet die Genexpression der gebundenen mRNA. Liegt lediglich eine partielle Komplementarität (d.h. nur im Bereich der seed sequence) vor, wird nur die Translation der mRNA inhibiert, liegt hingegen eine vollständigere Komplementarität (d.h. eine über die seed sequence hinausgehende komplementäre Basenpaarung) vor, so kann die mRNA sogar degradiert werden <sup>[5, 18, 57, 66, 73]</sup>.

Mögliche Bindestellen von miRs können durch Berücksichtigung vielfältiger Kriterien, wie beispielsweise nahezu perfekter Watson-Crick-Basenpaarung am 5' Ende der miRNAs mit Programmen, wie z.B. TargetScan vorhergesagt werden. Dabei besitzt eine miRNA meist mehrere Zielgene und einzelne Zielgene können jeweils durch mehrere miRNAs reguliert werden <sup>[6]</sup>.

#### 1.4 MiRNAs im Rahmen des Krankheitsbilds der Sepsis

Bei diversen Krankheitsbildern, wie der Entstehung von Herzerkrankungen, Krebs und psychischen Erkrankungen <sup>[66]</sup>, Autoimmunerkrankungen (rheumatoiden Arthritis, systemischen Lupus erythematodes) konnten bereits Veränderungen der miRNA-Expressionsmuster nachgewiesen werden <sup>[55]</sup>. Erste praktische Anwendung werden miRNAs vermutlich zunächst als Biomarker finden <sup>[75]</sup>. Therapeutische Einsatzmöglichkeiten sind bis heute noch nicht ausgereift, jedoch bestehen mögliche Konzepte <sup>[71]</sup>, sodass es sinnvoll ist die Funktion der miRNAs genauer zu verstehen.

Ein Stellenwert von miRs bei Sepsis ist angesichts der bereits erfolgreich untersuchten Zusammenhänge im Rahmen anderer Krankheitsbilder naheliegend. Bei der Immunantwort im Allgemeinen konnten mittels *in vitro* Analysen humaner Blutzellen sowie mittels Untersuchungen im Mausmodell zahlreichen miRNAs eine Funktion zugewiesen werden <sup>[29, 47]</sup>. Namentliche Erwähnung finden dabei die miR-125b, miR-126, miR-132, miR-145, miR-146, miR-155, miR-181, miR-187, miR-221, miR-222, miR-223, miR-30c, miR-421, miR449a/b und Let-7. Zudem wurde in *in vitro* Analysen sowie durch Überexpression bestimmter miRNAs im Mausmodell beispielsweise die Regulation von TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-

18, ICAM-1, VCAM-1 und PAI-1 durch miRNAs untersucht <sup>[47]</sup>. Es konnte dabei eine Modulation der Entwicklung und Differenzierung von B- und T-Zellen, der Proliferation von Monozyten und Neutrophilen, des Klassenwechsels von Antikörpern und der Freisetzung von Entzündungsmediatoren gezeigt werden <sup>[47]</sup>. Umgekehrt konnte teils auch ein Einfluss von Mediatoren auf die miRNA-Expression beobachtet werden <sup>[1, 32]</sup>.

Auch bezüglich des speziellen Krankheitsbilds der Sepsis liegen Studien vor: In Mäusen mit durch intraperitoneale Injektion von LPS (LPS-Modell) induzierter septischer Herzinsuffizienz zeigte sich eine vermehrte miR-155 Expression in Serum und Myokard. Da die Hemmung der miR-155 Expression durch Zugabe einer antagonisierenden antagomiR zu einer Verbesserung der Herzfunktion führte, wird der Verdacht der miR-155 Wirkung auf die Herzfunktion unterstrichen <sup>[70]</sup>. Gegensätzliches wird für die miR-125 vermutet: so scheint die miR-125 Transfektion im cecal ligation and puncture (CLP)-Modell einen positiven Effekt auf die Herzfunktion zu haben <sup>[43]</sup>. Im CLP-Modell wird bei Mäusen eine Sepsis aufgrund bakterieller Peritonitis nach induzierter Darmperforation hervorgerufen.

MiR-155-5p und miR-133a-3p erwiesen sich in der mRNA-Expressionsanalyse im Serum von septischen Patienten auf Intensivstationen zudem als potentielle diagnostische Parameter bei Sepsis. Die miR-155-5p könnte laut der Studie zudem zusätzlich als Prognoseparameter dienen <sup>[34]</sup>, höhere miR-155-Spiegel korrelieren auch in anderen Studien mit einem schlechteren 28-Tage Überleben. Dabei wurde ein potentieller Wirkmechanismus der miR-155 aufgezeigt. Höhere miR-155-Spiegel im Blut von Sepsispatienten führen zu einer Zunahme von CD39(+) regulatorischen T-Zellen, was zur Immunsuppression bei Sepsis beitragen kann <sup>[40]</sup>.

Des Weiteren ist möglicherweise anhand von miRNA-Expressionsprofilen eine Unterscheidung von SIRS und Sepsis möglich. Eine aktuelle Studie wies hierfür sechs CIR-miRNAs (miR-30d-5p, miR-30a-5p, miR-192-5p, miR-26a-5p, miR-23a-5p, miR-191-5p) nach, die eine Abgrenzung von schwerer Sepsis gegenüber SIRS ermöglichen <sup>[12]</sup>. Hierzu wurde die miRNA-Expression im Blut von Patienten mit intraabdomineller Sepsis mit Patienten mit SIRS nicht infektiöser Genese verglichen.

Die miR-23a-5p konnte im LPS-Modell als potentieller Marker für ein durch Sepsis induziertes ARDS identifiziert werden <sup>[41]</sup>.

In Mäusen, in welchen durch intraperitoneale Injektion von Faeces Sepsis induziert worden war, konnte eine vermehrte Expression der miR-195 in Lunge und Leber beobachtet werden. Die Hemmung der miR-195 Expression führte über verschiedene Mechanismen zu einer Verbesserung des Überlebens bei Sepsis. Dies war mit einer gesteigerten Expression von Bcl-2, Sirt1, und Pim-1 assoziiert <sup>[76]</sup>.

## 1.5 Zielsetzung

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde eine Arrayanalyse von T-Zellen von Sepsis-Patienten im Vergleich zu Gesunden durchgeführt. Hierbei konnten mehrere differenziell exprimierte miRNAs identifiziert werden; eine dieser miRNAs ist miR-93. Die miR-93-Expression zeigte sich in T-Lymphozyten von Patienten mit Sepsis hierbei deutlich stärker als bei gesunden Probanden. Eine biologische Relevanz der miR-93 im Krankheitsbild der Sepsis ist daher denkbar.

Ziel dieser Arbeit sollte daher sein, mögliche Zielgene der miR-93 *in silico* zu identifizieren und diese mittels und *in vitro* Analysen experimentell zu validieren.

Gefundene Zielgene sollten nachfolgend experimentell mittels *in vitro* Analysen bezüglich der biologische Funktion untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Alle für die Erstellung der Dissertation verwendeten Materialien und deren Hersteller finden sich nachfolgend alphabetisch aufgelistet. Wenn möglich sind die Firmensitze in Deutschland angegeben.

#### 2.1.1 Geräte

AGFA Curix 60	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, B
Attune® Acoustic Focusing Cytometer	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Autoklav DE-45	Systemec GmbH, Wettenberg
DynaMag™-2 Magnet	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Eluator™ Vacum Elution Device	Promega GmbH, Mannheim
E-BOX VX2 Geldokumentationssystem	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Feinwaage MP 300	Chyo Balance Corp., Kyoto, Japan
Inkubationsschrank CB 150	Binder GmbH, Tuttlingen
Inkubationsschrank BD 115 (Mikrobiologie)	Binder GmbH, Tuttlingen
Kompaktthermoschüttler KS 15 Control mit Inkubationshaube TH 15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Lumat LB 9507	BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Light Cycler® 480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Microplate Reader MRX	Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, USA
Mikroskop Modell IB	Exacta + Optech, San Prospero (MO), Italien
Mikrozentrifuge Centrifuge 5425 R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrozentrifuge Mikro 200	Andreas Hettich GmbH Co. KG, Tuttlingen
Milli-Q® Advantage A10 Ultrapure Water Purification System	Millipore GmbH, Schwalbach am Taunus
NanoDrop ND-2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neon™ Pipette	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Neon™ Transfection System	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Quadro MACS® Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Pipettierhilfe Pipetboy comfort	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Pipetten Eppendorf Reference®	Eppendorf AG, Hamburg

Power Pac Basic Electrophoresis Power Supply Unit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RCT basic (Magnetrührer mit Heizung)	IKA®-Werke GmbH Co. KG, Staufen
Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
Sterilwerkbank Hera Save	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Sub-Cell® GT Elektrophorese System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spectrophotometer NanoDrop 2000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermocycler Mastercycler® gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler Mastercycler® pro S	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifuge TGA-50	Hemotec, Gelterkinden; CH
Vacuum Manifold	Promega GmbH, Mannheim
Vakuumsaugpumpe BVC 21	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortexschüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad SWB 25	Haake-Technik, Vreden
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Agfa Cronex 5, Medical X-Ray Film	Agfa HealthCare NV, Mortsels, Belgien
CELLSTAR® 6 bzw. 12 Well Zellkultur Multiwell Platten	Greiner Bio-One, GmbH, Frickenhausen
CELLSTAR® Filter Top Zellkultur Flaschen 25 T/ 75 T	Greiner Bio-One, GmbH, Frickenhausen
CELLSTAR® Tubes 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Handschuhe Latex, unsteril	Sempermed, Wien, Österreich
Handschute Latex frei, unsteril	Sempermed, Wien, Österreich
Light Cycler® 480 Multiwell Plates 96, Plates with sealing foil	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lithium-Heparin Röhrchen Monovette 9 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
MACS® Separation Columns LS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mini-Spike®	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Multifly® Set 20 G Schlauch 20 cm	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Perfusionsspritze BD Plastipak™ 50 ml	BD, Drogheda, Ireland

Pipettenspitzen, steril	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen, unsteril	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Pipettenspitzen mit Filter, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reagenzröhrchen 0,5 ml/ 1,5 ml, steril	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzröhrchen 2 ml, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reagenzröhrchen 1,5 ml/ 2 ml, autoklaviert, 5 ml, 13 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Reagenzröhrchen 0,2 ml, autoklaviert	Eppendorf AG, Hamburg
Stripette® 5 ml/ 10 ml/ 25 ml, steril	Corning New, York, Amerika
Vi-Cell Reagent Pak	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

### 2.1.3 Assays und Kits

Dual Glo® Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim
MACS® Pan T Cell Isolation Kit II (human)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS® CD4+ Cell Isolation Kit II (human)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Neon™ Transfection System 10 µl Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Neon™ Transfection System 100 µl Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Fisher Scientific- Germany GmbH, Schwerte
Pure Yield™ Plasmid Midiprep System	Promega GmbH, Mannheim
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuickChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
RNAqueous®-Phenol-free total RNA Isolation Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
StataClone™ Solo Pack® Competent Cells	Agilent Technologies, Waldbronn
SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Assay für hsa-miR 93	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Assay für Kontrolle U47	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription	Applied Biosystems Deutschland GmbH,



Kit	Darmstadt
TURBO DNA-free™ Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Violet Chromatin Condensation/Dead Cell Apoptosis Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Wizard® SV and PCR Clean-Up System	Promega GmbH, Mannheim

#### 2.1.4 Reagenzien

6 x DNA Loading Dye	Fisher Scientific- Germany GmbH, Schwerte
20X LumiGLO® Reagent and 20X Peroxide	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
30% Acrylamid/ Bis Solution	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose Serva Tablets (0,5 g/ Tablette)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Anti-mouse IgG, HRP linked Antibody	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
Anti-rabbit IgG, HRP linked Antibody	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
Attune™ 10x Shutdown Solution	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Attune™ Focusiong Fluid	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Attune™ Performance Beads	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Attune™ Wash Solution	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
autoMACS® Rinsing Solution	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Blotting-Grade Blocker (non-fat dry milk)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenol Blue	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BSA (bovine serum albumin) 100x	New England BioLabs GmbH., Frankfurt am Main
Cell Lysis Buffer ( 10x)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche Diagnostics, Mannheim

DMEM (Dulbecco's Modifieds Eale Medium)	Lonza Cologne GmbH, Köln
DNA Ladder 100 bp	Promega GmbH, Mannheim
DNA Ladder 1 kb	Thermo Fisher scientific Inc., Waltham, USA
DRAK2 Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Ethanol 100% für Molekularbiologie	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol vergällt 70%	Apotheke Innenstadt, Universität München
Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Glycerol (100 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hank'sche Lösung (HBSS) ohne Phenolrot	Apotheke Innenstadt, Universität München
Hefeextrakt SERVABACTER® pulverförmig	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Histopaque®-1077 (Dichte 1,077g/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin
Light Cycler® 480 Probesmaster	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Monoklonaler β-Aktin-Antikörper (AC-15)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
New England Buffer 4 (10x)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
Oligo-dT Primer	Qiagen GmbH, Hilden
ON-TARGETplus Non-targeting Pool	Fisher Scientific– Germany GmbH, Schwerte
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fisher Scientific– Germany GmbH, Schwerte
Pfu-Ultra II fusion HS DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Pfu-Ultra II Reaction Buffer 10x	Stratagene, La Jolla, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,4	Apotheke Innenstadt, München
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	VWR International GmbH, Darmstadt
Pre-miR™ miRNA Precursor Molecules	Life Technologies GmbH, Darmstadt
hsa-miR-93-5p	
Pre-miR™ miRNA Precursor Molecules	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Negative Control #1	
Protease/ Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA

psiCHECK™-2 Vektor	Promega GmbH, Mannheim
Random Hexamers	Qiagen GmbH, Hilden
Restriktionsenzym <i>PmeI</i>	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
Restriktionsenzym <i>XhoI</i>	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
RNaseOut™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen GmbH, Darmstadt
RPMI-Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SMARTpool: ON-TARGETplus STK17B-siRNA	Fisher Scientific– Germany GmbH, Schwerte
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4 DNA Ligase	Promega GmbH, Mannheim
T4 DNA Ligase Puffer 10x	Promega GmbH, Mannheim
Taq Polymerase	Jena Bioscience GmbH, Jena
Taq Polymerase 10x Reaktionspuffer	Jena Bioscience GmbH, Jena
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer 5x, pH 8,3	Amresco Inc., Solon, USA
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vi-Cell Reagent Pak	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

### 2.1.5 Selbsthergestellte Gele, Puffer und Medien

#### Gele

##### 1%iges Agarose-Gel

Agarose	1 g
TBE-Puffer	100 ml
Ethidiumbromid	7,5 µl

## SDS-Polyacrylamidgele

	<b>Trenngel (10%ig)</b>	<b>Sammelgel (6%ig)</b>
H <sub>2</sub> O	2,81 ml	1,95 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8 durch HCl eingestellt)	1,75 ml	-
Sammelgelpuffer (1,0 M Tris, pH 8,8 durch HCl eingestellt)	-	375 µl
10 %iges SDS	70 µl	30 µl
30%iges Acrylamid/Bisacrylamid	2,83 ml	600 µl
40 %iges APS	35 µl	15 µl
Temed	2,9 µl	3,0 µl

## Puffer

### MACS®-Seperation-Buffer (=Puffer A):

MACS™ BSA Stock solution 1:20 in autoMACS™ rinsing solution verdünnt

### 5x SDS-Probenpuffer

Tris-HCl	0,1 M
Glycerin	10 %
SDS	2 %
Bromphenolblau	0,05%
β-Mercaptoethanol	1 %

### Transferpuffer 10x

Tris	250 mM
Glycin	1,92 M

### Stripping Buffer (pH 2,2)

Glycin	1,5 g
SDS	0,1 g
Tween®-20	1 ml
Wasser	100 ml

## **Medien**

### **DMEM-Medium (HEK-Medium; Dulbeccos' Modified Eagle Medium)**

DMEM-Medium	500 ml
FCS (hitzeinaktiviert)	10%
L-Glutamin	1 %
Penicillin-Streptomycin	1 %
NEAA	1 %

### **LB-Agar (Luria Bertani Agar)**

Trypton	5 g
Natriumchlorid	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
Agar	7,5 g
ddH <sub>2</sub> O	500 ml

### **LB-Medium (Luria Bertani Medium)**

Trypton	5 g
Natriumchlorid	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
ddH <sub>2</sub> O	500 ml

### **RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute Medium)**

RPMI-Medium	500 ml
FCS (hitzeinaktiviert)	10%
L-Glutamin	1 %
Penicillin-Streptomycin	1 %
HEPES	1 %

## 2.1.6 Primer

<b>Primer für Real-Time-PCR und Universal Probe Library (UPL) Set, Human von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</b>		
Verwendete Real-Time-PCR-Primer und UPL-Sonden...		
<b>UPL-Sonde</b>	<b>Primerbezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
#132	SDHA #132 forward	5'-GAG GCA GGG TTT AAT ACA GCA-3'
	SDHA #132 reverse	5'-CCA GTT GTC CTC CTC CAT GT-3'
#87	TBP #87 forward	5'-GAA CAT CAT GGA TCA GAA CAA CA-3'
	TBP #87 reverse	5'-ATA GGG ATT CCG GGA GTC AT-3'
#39	STK17B #39 forward	5'-CAA GTG AAA TCA TTT TGA TAT TGG AA-3'
	STK17B #39 reverse	5'-GCC AAC TCA GGT AAA CAC AGG-3'
#65	IL-2 #65 forward	5'-AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG G-3'
	IL-2 #65 reverse	5'-AAG TGA AAG TTT TTG CTT TGA GCT A-3'
#6	BCL-2 #6 forward	5'-ACA GAG GAT CAT GCT GTA CTT AAA AA-3'
	BCL-2 #6 reverse	5'-TTA TTT CAT GAG GCA CGT TAT TAT TAG-3'
#38	IL-4 #38 forward	5'-TGC CTC ACA TTG TCA CTG C-3'
	IL-4 #38 reverse	5'-GCA CAT GCT AGC AGG AAG AAC-3'
#67	IL-10 #67 forward	5'-TGC CTT CAG CAG AGT GAA GA-3'
	IL-10 #67 reverse	5'-GCA ACC CAG GTA ACC CTT AAA-3'
#8	IL-17A #8 forward	5'-TGG GAA GAC CTC ATT GGT GT-3'
	IL-17A #8 reverse	5'-GGA TTT CGT GGG ATT GTG AT-3'
#21	INF $\gamma$ #21 forward	5'-GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA G-3'
	INF $\gamma$ #21 reverse	5'-TTT GGA TGC TCT GGT CAT CTT-3'
# 65	Foxp3 #65 forward	5'-CCT TGC CCC ACT TAC AGG-3'
	Foxp3 # 65 reverse	5'-CCA CCG TTG AGA GCT GGT-3'
#31	TGF $\beta$ #31 forward	5'-ACT ACT ACG CCA AGG AGG TCA C-3'
	TGF $\beta$ # 31 reverse	5'-TGC TTG AAC TTG TCA TAG ATT TCG-3'
#4	STAT3 #4 forward	5'-GGC CAT CTT GAG CAC TAA GC-3'
	STAT3 #4 reverse	5'-CGG ACT GGA TCT GGG TCT TA-3'
<b>PCR-Primer</b>		
Primer STK17B 3'UTR forward (Teil 1)		5'-GTT TAA ACC CAC TCC AGT GAG ATT ATG ATT TG-3'
Primer STK17B 3'UTR reverse (Teil 1)		5'-CTC GAG TGA AGA CAT TAA AGG AAT TCA CCA-3'

Primer STK17B 3'UTR forward (Teil 2)	5'-GTT TAA ACT GTC CAT TTA CTT GCC TTT GG-3'
Primer STK17B 3'UTR reverse (Teil 2)	5'-CTC GAG GGC TAG AAC ATG CAG ACA TAC TT-3'
Primer SCB Topovektor forward	5'-CTC GAG GTC GAC GGT ATC-3'
Primer SCB Topovektor reverse	5'-GCC TCT TCG CTA TTA CGC-3
PsiCHECK Primer forward	5'-CTG AGG AGT TCG CTG CCT AC-3'
PsiCHECK Primer reverse	5'-GAG CAG ACC GAA AAG GTC AC-3'
<b>Mutageneseprimer</b> (mutierte Basen sind unterstrichen)	
Mutageneseprimer 1 STK17B forward)	5'-TCA TAT ATG ACA TGT TTA TAT TGT AAA TGC <u>AAG</u> TTT CCA TGG AAT AAT TTA GGG AAG TGT TTT A-3'
Mutageneseprimer 1 STK17B reverse	5'-TAA AAC ACT TCC CTA AAT TAT TCC ATG GAA <u>ACT</u> TGC ATT TAC AAT ATA AAC ATG TCA TAT ATG A-3'
Mutageneseprimer 2 STK17B forward	5'-CTT AAA ACT TTT TGA ATA ACT ATC AGG TCA <u>AGT</u> TAT TTG ACC ACA TGG TGA ATT CCT TTA AT-3'
Mutageneseprimer 2 STK17B reverse	5'-ATT AAA GGA ATT CAC CAT GTG GTC AAA TAA <u>CIT</u> GAC CTG ATA GTT ATT CAA AAA GTT TTA AG-3'
Mutageneseprimer 3 STK17B forward	5'-CTG AGC AGT GAA ATT GTA ATG GCA <u>AGT</u> TAA AGG AAG TAA GCC GTT AAC TG-3'
Mutageneseprimer 3 STK17B reverse	5'-CAG TTA ACG GCT TAC TTC CTT TAA <u>CIT</u> GCC ATT ACA ATT TCA CTG CTC AG-3'
Mutageneseprimer 4 STK17B forward	5'-TGA CCA TTC TGG CTA AAA ATT AAA AAG CAA <u>GTT</u> TTT ATA TCT GTG GTT GTC ATT TGT TTC-3'
Mutageneseprimer 4 STK17B reverse	5'-GAA ACA AAT GAC AAG CAC AGA TAT AAA <u>AAC</u> ITG CTT TTT AAT TTT TAG CCA GAA TGG TCA-3'
<b>Sequenzierungsprimer</b>	
PsiCheck 2	5'-ACC CTG GGT TCT TTT CCA AC-3'

**Tabelle 2.1:** Verwendeter Primer

### 2.1.7 Software

Attune®Cytometric Software	Applied Biosystems, Foster City, USA
BLAST®	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
Light Cycler® 480 Relative Quantification Software	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microsoft® Office 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
ModFit LT 3.2	Verity Software House, Inc., Topsham, ME, USA
NEBcutter Version 2.0	<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/">http://tools.neb.com/NEBcutter2/</a>
Primer3 Input Version 0.4.0	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3/">http://frodo.wi.mit.edu/primer3/</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>
QuikChange Primer Design	<a href="http://www.agilent.com/genomics/qcpd">www.agilent.com/genomics/qcpd</a>
Segal Lab	<a href="http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html">http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html</a>
SigmaPlot12.0	Systat Software Inc., San Jose, California, USA
TargetScanHuman 6.0	<a href="http://www.targetscan.org/">http://www.targetscan.org/</a>
Universal ProbeLibrary Assay Design Center	<a href="https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000">https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000</a>

### 2.1.8 Proben

Humane T-Lymphozyten wurden aus dem Blut freiwilliger gesunder Probanden bzw. aus Blut von Patienten mit Sepsis Gewonnen. Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität hat die Studie genehmigt (No. 107-11).



## 2.2 Methoden

Die Herstellerhinweise wurden bei der Verwendung der genannten Produkte beachtet. Unter 2 sind diesbezüglich alle Geräte und Materialien sowie selbst hergestellte Produkte und verwendete Software mit Herstellerverweis aufgelistet.

Das Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System wurde zur Gewinnung nukleasefreien Wassers verwendet.

### 2.2.1 Zellkulturen

Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sterilwerkbank, Typ HS 12/2 von Heraeus Holding GmbH, durchgeführt. Inkubiert wurde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in 25T bzw. 75T-Zellkulturflaschen. Alle 3 Tage wurden Medium und Kulturflasche erneuert. Bei Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen gesplittet.

Anschließend sind die verwendeten Zelllinien beschrieben.

#### **Jurkat-Zellen**

Jurkat-Zellen sind immortalisierte T-Lymphozyten, welche ursprünglich aus Blut eines T-Zell-Leukämie-Patienten gewonnen wurden. Sie wurden als Suspensionszellen in RPMI-Medium kultiviert.

#### **HEK Zellen**

Human Embryonic Kidney (HEK-293) –Zellen sind menschliche, embryonale Nierenzellen. Diese wurden durch Einbau von DNA des Adenovirus 5 immortalisiert. Sie wurden als Adhäsionszellen in HEK-Medium kultiviert. Gelöst wurden sie mit Trypsin/EDTA.

#### ***E. coli* Bakterien**

*E. coli* Bakterien sind gramnegative Stäbchen, welche bei Klonierungen nach Transformation für die Vermehrung von Plasmiden verwendet werden können. Sie wurden auf LB-Agar-Platten kultiviert.

### 2.2.2 Gewinnung von primären T-Zellen

#### **Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes**

Für die Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells, kurz PBMCs) wurde von Patienten mit schwerer Sepsis innerhalb von 24

Stunden nach Diagnosestellung, d.h. in der Frühphase der Sepsis, heparinisertes, venöses Vollblut gewonnen. Vergleichend wurde heparinisertes, venöses Vollblut von gesunden, freiwilligen Probanden gewonnen.

Davon wurden je 3 ml über 3 ml Histopaque-Ficoll (HISTOPAQUE®-1077) in Mikroröhrchen geschichtet. Diese wurden bei 3000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert, sodass das Blut aufgrund von Dichteunterschieden in Schichten aufgetrennt wurde (Ultragradientenzentrifugation): Erythrozyten aggregieren mit Polysuccrose, Granulozyten hypertonisieren und sinken ab. Zwischen der obersten Schicht aus Plasma und der tiefer liegenden Ficollschicht findet sich eine Grenzschicht aus mononukleären Zellen. Diese Schicht wurde in ein neues Mikroröhrchen abpipettiert. Anschließend wurde zweimal mit HBSS (Hank'sche Lösung ohne Phenolrot) durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 Minuten gewaschen um Thrombozyten und Ficoll zu entfernen.

### **Zellzählung**

Die mononukleären Zellen wurden in 1 ml HBSS resuspendiert und mittels Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer gezählt. Der Vi-Cell färbt nicht lebensfähige bzw. tote Zellen mit Trypanblau an. Anschließend wird die Flüssigkeit in eine Quarz-Durchflusszelle zur Bilderfassung transportiert, wo durch Bildanalyse die Zellen gezählt und aufgrund von Graustufenunterschieden die Viabilität (Lebendzellzahl dividiert durch Gesamtzellzahl) bestimmt werden. Nach erneutem Waschen der restlichen Zellen und Entfernen des gesamten Überstands folgte die Isolation der Pan-T-Zellen (CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>) bzw. der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

### **Isolation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels MACS® CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II (human)**

Die Separation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgte mittels Negativselektion. Hierfür wurden pro 10 Millionen mononukleärer Zellen 40 µl Puffer A und 10 µl Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Biotin-Antibody-Cocktail zugegeben. Dieser enthält Antikörper, welche an alle nicht gewünschten Zellen binden (entsprechend dem Prinzip der Negativselektion an CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD45RO, CD56, CD123, T TCRγ/δ, HLA-DR und Glykophorin A). Nach 5 Minuten Inkubation bei 4 °C wurden weitere 30 µl Puffer A sowie 20 µl Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Anti-Biotin-Microbeads pro 10 Millionen Zellen zugegeben. Diese binden an den Biotin-Teil der Antikörper des Biotin-Antibody-Cocktails. Durch die gebundenen Microbeads wurden die nicht gewünschten Zellen durch Inkubation für 10 Minuten bei 4 °C magnetisch markiert.

Nun wurde erneut mit Puffer A gewaschen (2000 rpm für 5 Minuten). Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 500 µl Puffer A resuspendiert und auf eine vorbereitete (d.h. mit 3 ml Puffer A gewaschene), im Feld eines starken Magneten (Quadro MACS® Separator)

befindliche MACS® Separation Column LS überführt. Das Effluat wurde in einem neuen Mikroröhrchen aufgefangen und enthielt nun nur noch die gewünschten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, da alle anderen markierten Zellen im Magnetfeld verblieben. Es wurde noch dreimal mit je 3 ml Puffer nachgespült um alle gewünschten Zellen zu gewinnen, bevor nach Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 Minuten, Entfernen des Überstands sowie Resuspendieren in 1 ml PBS die Zellen wie oben gezählt wurden.

### **Isolation der Pan-T-Zellen mittels MACS® Pan T Cell Isolation Kit II (human)**

Diese erfolgte analog der Isolation der CD4<sup>+</sup>-Zellen. Hierfür wurde entsprechend Pan T Cell Biotin-Antibody-Cocktail statt Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Biotin-Antibody-Cocktail (bindet jedoch nicht an CD8, CD25, CD45RO, TCR $\gamma/\delta$  und HLA-DR; Inkubationszeit hier 10 Minuten) sowie Pan T Cell Anti-Biotin-Microbeads statt Naive CD4<sup>+</sup>T Cell Anti-Biotin-Microbeads (Inkubationszeit hier 15 Minuten) verwendet.

### **2.2.3 Transfektion durch Elektroporation mittels Neon™ Transfection System**

Das Neon™ Transfection System basiert auf dem Prinzip der Elektroporation, bei welcher in einem elektrischen Feld befindliche Zellen kurzfristig porös werden, sodass kleine Partikel wie RNA oder DNA in die Zellen gelangen können. Durch Anlegen einer Stromspannung zwischen zwei kleinflächigen Elektroden wird ein relativ gleichmäßiges, elektrisches Feld mit konstantem pH-Wert und wenig Ionen- und Hitzeentstehung generiert. Die Pipettenspitze der Neon™ Pipette (100  $\mu$ l bzw. 10  $\mu$ l Kit) dient als Elektroporationskammer und enthält selbst eine der beiden Elektroden, welche goldbeschichtet ist.

Es ist von Vorteil, bei der Transfektion wenige Elektrolyte in der Zellsuspension und keine Luftblasen in der Pipette zu haben, da diese einen Stromfluss bzw. Lichtbogen begünstigen, welche die Zellen schädigen. Deswegen wurde zur Resuspension PBS und in Folge entsprechender Resuspensionspuffer verwendet. Es wurden stets Triplikate in einer Serie transfiziert, außer bei den Versuchen zur Apoptose.

Jurkat-Zellen und primäre T-Zellen wurden mit dem Neon™ Transfection System 100  $\mu$ l Kit und Resuspensionspuffer R (bei Jurkat-Zellen) bzw. T (bei primären T-Zellen) transfiziert. Dabei wurden pro Well 2 Millionen Zellen (6 Well Platte) bzw. 1 Million Zellen (12 Well Platte) mit 50 nM premiR (premiR-93 oder -NC) bzw. siRNA (siSTK17B oder siNC) folgendermaßen transfiziert: Bei Jurkat-Zellen wurden 1800 V für 20 Millisekunden, bei primären T-Zellen 2100 V für 20 Millisekunden einmalig angelegt. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 (bei Transfektion mit premiR) bzw. 48 Stunden (bei Transfektion mit

siRNA) in RPMI-Medium ohne Antibiotikum inkubiert. Endvolumen pro Well waren dabei 2000 µl bei einer 6 Well Platte bzw. 1000 µl bei einer 12 Well Platte.

Nach 4 bis 6 Stunden wurden die Zellen mit 25 µl Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 pro Well stimuliert. Die Beads wurden zuvor mit PBS gewaschen und in gleichem Volumen geeigneten Mediums resuspendiert.

Für die Transfektion von HEK-Zellen zur Ermittlung der Luciferase-Aktivität wurde mit dem Neon™ Transfection System 10 µl Kit und Resuspensionspuffer R gearbeitet. Hierfür wurden pro Well einer 12 Well Platte 100 000 Zellen mit 1 µl 50 nM premiR-93 bzw. -NC und 1 µg DNA (psiCheck-2-Reporterplasmid mit 3'UTR bzw. mutiertem 3'UTR von STK17B) ko-transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit zwei Pulsen für je 20 Millisekunden und 1150 V. Es folgte eine Inkubation der HEK-Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 48 Stunden in HEK Medium ohne Antibiotikum bei einem Endvolumen von 1000 µl.

#### **2.2.4 RNA Isolation mittels RNAqueous®-Phenol-free total RNA Isolation Kit**

Zur RNA-Isolation mit dem RNAqueous®-Phenol-free total RNA Isolation Kit wurden die Zellen in Reagenzröhrchen, überführt und bei 2000 rpm 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in 350 µl RNAqueous Lysepuffer resuspendiert. Dadurch wurden die Zellen aufgebrochen und Ribonukleasen inaktiviert. Es wurde das gleiche Volumen 64%igen Ethanol zugesetzt und die Suspension je auf einen Filter (Micro Filter Cartridge Assembly), welcher selektiv RNA bindet, in einem Elutionstube pipettiert. Dies wurde bei 13'200 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert und anschließend das Effluat verworfen. Analog wurde nun der Filter mit nacheinander 700 µl Waschlösung 1 sowie zweimalig 500 µl Waschlösung 2/3 durch Zentrifugation gewaschen und schließlich einmal trocken zentrifugiert. Der Filter wurde in ein neues Elutionstube überführt und die darauf gebundene RNA mit 30 µl 75 °C warmem, nukleasefreiem Wasser eluiert: Nach 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert.

Um möglicherweise noch enthaltene DNA zu entfernen folgte ein DNase-Verdau. Hierfür wurden pro Reagenzröhrchen je 3,0 µl 10x DNase Puffer sowie 1,0 µl Turbo DNase (Ambion AM 1907) zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 3 µl DNase Inactivation Reagent zugesetzt und es wurde erneut gemischt um den Verdau zu beenden. Nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 13'200 rpm für 1,5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles Reagenzröhrchen überführt. Es enthält die isolierte RNA. Das gebildete Pellet enthält das DNase Inactivation Reagent.

Die Bestimmung der RNA- bzw. DNA-Konzentration und Qualität erfolgte am Nano Drop 2000. Hierfür wird 1 µl Lösung eingesetzt. Als Lichtquelle für die spektralphotometrische Messung dient ein Xenon Blitzlicht, als Detektor ein Silizium –CCD Sensor.

### **2.2.5 Umschrift in cDNA**

Für die reverse Transkription in cDNA wurde je 1 µg RNA (oder gleiche RNA-Menge, falls RNA-Konzentration zu niedrig) in einem Zielvolumen von 10 µl verdünnt.

Anschließend wurden pro Ansatz 1 µl Oligo-dT-Primer, 1 µl Random-Hexamers und 1 µl Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) zugegeben. Der Ansatz wurde bei 65 °C für 5 Minuten zur Denaturierung in den Thermocycler gestellt.

Nun wurde pro Ansatz 4 µl 5x first strand buffer, 1 µl 0,1M DTT, 1 µl RNAse OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, welcher den Abbau von mRNA durch Ribonukleasen verhindert und 1 µl SuperScript™ III Reverse Transcriptase (200 U) zugefügt. Die Proben durchliefen im Thermocycler daraufhin mehrere Phasen: das Annealing für 5 Minuten bei 25 °C, währenddessen sich die Primer anlagerten, dann 45 Minuten bei 50 °C zur cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase und zuletzt 15 Minuten Inkubation bei 70 °C zur Enzyminaktivierung.

### **2.2.6 Real-time quantitative PCR mit den Light Cycler® 480 Multiwell Plates von Roche Diagnostics GmbH**

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Nukleotidsequenzen exponentiell vervielfältigt. Dies wird Amplifikation genannt. Als Vorlage dient eingesetzte Template-cDNA. Diese wird durch Denaturierung bei 95°C in cDNA-Einzelstränge gespalten. Nachfolgend binden Primer beim sogenannten Annealing an die cDNA-Einzelstränge. Abhängig von der Zusammensetzung der Primer herrschen hierbei idealerweise 50-65 °C. Bei der anschließenden Elongation werden die DNA-Einzelstränge ausgehend von den Primern durch hitzestabile DNA-Polymerasen mit dNTPs zu DNA-Doppelsträngen komplettiert. Optimale Reaktionstemperatur hierfür ist z.B für die Taq-Polymerase 72 °C.

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (engl. real-time quantitative PCR, kurz qPCR) ist die absolute oder relative Quantifizierung der eingesetzten DNA möglich. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine relative Quantifizierung von mRNA. Zur relativen Quantifizierung wurden, gleichzeitig mit den zu untersuchenden Genen, Referenzgene amplifiziert, welche nicht reguliert und daher konstant exprimiert werden. Es ergibt sich konsekutiv eine dimensionslose Zahl, welche die relative Genexpression bezogen auf das gewählte Referenzgen beschreibt.

Die Versuche wurden mit dem Light Cycler® 480, Light Cycler® 480 Multiwell Plates und Universal Probe Library (UPL)-Sonden (Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt.

Durch Einsatz der fluoreszenzmarkierten UPL-Sonden ist eine sequenzspezifische Analyse möglich. Dabei wird das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) ausgenutzt. Die UPL-Sonden sind „hydrolysis probes“, tragen als Fluoreszenzfarbstoffe am

5'-Ende Fluorescein als Reporter (FAM) und am 3'-Ende einen „dark quencher dye“. Es erfolgt eine Anregung des Fluoresceins bei geeigneter Wellenlänge. Die Energie wird anschließend auf den benachbarten Fluoreszenzfarbstoff, den Dark-quencher, übertragen. Der Dark-quencher unterbindet die charakteristische Fluoreszenz des Fluoresceins solange beide räumlich nah beieinander liegen.

Die UPL-Sonde lagert sich während des Annealings spezifisch an zu vervielfältigende DNA nahe der Primer an. Während der Elongation spaltet die Taq-Polymerase durch die 5'- 3' Exonuklease-Aktivität die UPL-Sonde hydrolytisch. Dadurch werden Fluorescein und Dark-quencher voneinander getrennt, sodass bei Bestrahlung mit Licht im Anregungsspektrum des Fluoresceins, Fluoreszenz im Emissionsspektrum desselben messbar wird. Je mehr Sonden gespalten sind, also je mehr cDNA amplifiziert ist, umso stärker ist das Fluoreszenzsignal <sup>[52]</sup>.

Zunächst wird nur unspezifische Hintergrundfluoreszenz detektiert. Der Zyklus, an welchem die Fluoreszenz ein definiertes Niveau an Hintergrundfluoreszenz überschreitet, wird Crossing Point (C<sub>P</sub>-Wert) genannt. Der C<sub>P</sub>-Wert markiert den Beginn der sogenannten exponentiellen Phase der PCR.

Aus dem C<sub>P</sub>-Wert wurde durch die Light Cycler® 480 Relative Quantification Software die relative mRNA bzw. miRNA Expression effizienzkorrigiert ermittelt. Effizienzkorrigiert bedeutet, dass in der Berechnung berücksichtigt wurde, dass in einem PCR-Zyklus die DNA-Menge und somit auch die Fluoreszenzintensität nicht immer, wie ideal angenommen, mit einer Effizienz 2 (entspricht 100%) verläuft <sup>[56]</sup>.

### Quantifizierung von mRNA

Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit sequenzspezifischen Primern und UPL-Sonden (siehe Tabelle 2.1) jeweils in Doppelbestimmungen. Als Referenzgen wurde z.B. metTBP verwendet. Die cDNA-Proben wurden so verdünnt, dass eine finale Konzentration von 10 ng/Well eingesetzt werden konnte. Ein Reaktionsansatz (20 µl/Well) setzte sich dabei folgendermaßen zusammen:

cDNA (10 ng/Well)	5 µl
RNA/DNAse freies Wasser	4,4 µl
Primer forward	0,2 µl
Primer reverse	0,2 µl
Sonden aus der Universal ProbeLibrary (UPL) von Roche Diagnostics GmbH	0,2 µl
Probesmaster	10,0 µl

**Tabelle 2.2:** Einfacher Reaktionsansatz zur relativen Quantifizierung von mRNA

Die Reaktionsbedingungen im Light Cycler 480® waren folgendermaßen:

Initiale Denaturierung	95°C	10 Minuten	
Denaturierung	95°C	10 Sekunden	50 Zyklen
Primer-Annealing	60°C	30 Sekunden	
Elongation	40°C	1 Sekunde	
Finale Elongation	40°C	30 Sekunden	

**Tabelle 2.3:** Reaktionsbedingungen zur relativen Quantifizierung von mRNA

### Quantifizierung von miRNA (TaqMan®-Assay)

Um die Expression reifer Micro-RNA quantitativ zu bestimmen, wurde ein TaqMan® MicroRNA Assay durchgeführt. Dabei wurde ebenfalls durch FRET Fluoreszenz erzeugt und anschließend detektiert. Die Sonden verfügten dafür auch hier am 5'-Ende über ein FAM™ reporter dye und am 3'-Ende über einen „nonfluorescent quencher“ (NFQ). Der NFQ unterdrückt bei intakten Sonden die Fluoreszenz des FAM™ reporter dye. Nach hydrolytischer Spaltung der Sonden durch die Taq-Polymerase wird die Fluoreszenz messbar. Am 3'-Ende sitzt bei diesen Sonden zusätzlich ein Minor Groove Binder (MGB). Dieser stabilisiert die Bindung der Sonden mit der DNA und ermöglicht so geringere Sondengrößen.

Zunächst wurde mittels mirVana™ miRNA Isolation Kit gewonnene gesamt-RNA aus PanT-Zellen von Sepsispatienten bzw. von gesunden Probanden mit dem TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll revers transkribiert. Analog wurde die relativ konstant exprimierte RNA U47 als endogene Referenz-RNA revers transkribiert. Dabei setzte sich ein einfacher Reaktionsansatz (15 µl) folgendermaßen zusammen:

Gesamt RNA (1-10 ng) bzw. Referenz-RNA	5 µl
100 mM dNTPs	0,15 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL)	1 µl
10 x Reverse Transcription Buffer	1,5 µl
RNase Inhibitor (20 U/µL)	0,19 µl
PCR-Grade Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	4,16 µl
5 x RT Primer	3 µl

**Tabelle 2.4:** TaqMan®-Assay: Einfacher Reaktionsansatz zur Transkription in cDNA

Es wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend im Thermocycler die RNA in cDNA umgeschrieben:

1. Schritt	30 Minuten	16 °C
2. Schritt	30 Minuten	42 °C
3. Schritt	5 Minuten	85 °C

**Tabelle 2.5:** TaqMan®-Assay: Reaktionsbedingungen zur Transkription in cDNA

Die Proben wurden folgend erneut auf Eis gestellt.

Direkt im Anschluss wurde in Doppelbestimmungen die Real-Time PCR mittels TaqMan® Micro RNA Assays, spezifisch für Micro-RNA-93 bzw. U47-Referenz-RNA, durchgeführt. Ein einfacher Reaktionsansatz (20 µl) bestand aus:

cDNA-Produkt der reversen Transkription	1,33 µl
TaqMan® MicroRNA Assay (20x)	1 µl
LightCycler® 480 Probes Master	10 µl
Nukleasefreies H <sub>2</sub> O	7,67 µl

**Tabelle 2.6:** TaqMan®-Assay: Einfacher Reaktionsansatz zur Quantifizierung reifer miRNA

Bei der Amplifikation im LightCycler herrschten folgende Reaktionsbedingungen:

Enzymaktivierung	10 Minuten	95 °C	45 Zyklen
Denaturierung	15 Sekunden	95 °C	
Annealing und Elongation	60 Sekunden	60 °C	

**Tabelle 2.7:** TaqMan®-Assay: Reaktionsbedingungen zur Quantifizierung reifer miRNA

### 2.2.7 Klonierung eines Reporterplasmids

Zum Nachweis einer direkten Interaktion der microRNA-93 (miR93) mit dem 3'UTR des STK17B-Gens wurde ein Reporterplasmid mit integrierten STK17B-3'UTR kloniert. Dazu wurden wie nachstehend beschrieben die 3' untranslatierte Region(3'UTR) der STK17B



(Serin Threonin Kinase) amplifiziert, dieser über mehrere Schritte in einen psiCHECK™-2 Vektor ligiert, in *E. coli* Bakterien vermehrt und die DNA abschließend durch Midiprep isoliert. Das gewonnene STK17B-3'UTR-Reporterplasmid wurde im Anschluss mit premiR-93 in HEK-293 Zellen ko-transfiziert und die unter 2.2.9 beschriebene Luciferase-Messung durchgeführt. Die Klonierungsarbeiten wurden in einem ausgewiesenen S1-Bereich durchgeführt.

### Amplifikation des 3'UTR durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der 3'UTR des STK17B-Gens wurde nach Extraktion genomischer DNA gesunder Probanden durch PCR mit dem StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit amplifiziert. Hierfür wurden die spezifischen Primer STK17B 3'UTR forward bzw. reverse (Sequenz siehe Tabelle 2.1) mit Schnittstellen für *PmeI* und *XhoI* designt und von der Metabion GmbH (Martinsried) bezogen. Ein einfacher Reaktionsansatz setzte sich dabei folgendermaßen zusammen:

Genomische DNA (50 ng)	0,5 µl
dNTP mix (25 mM je dNTP)	0,25 µl
Primer STK17B 3'UTR forward (10 µM)	0,5 µl
Primer STK17B 3'UTR reverse (10 µM)	0,5 µl
10x Pfu-Ultra II Reaction Buffer	2,5 µl
Pfu-Ultra II fusion HS DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
PCR-Grade nuklease-freies H <sub>2</sub> O	20,25 µl

**Tabelle 2.8:** Einfacher Reaktionsansatz zur Amplifikation des 3'UTR der STK17B

Die Reaktionsbedingungen im Thermocycler waren wie folgt:

Initiale Denaturierung	95 °C	2 Minuten	
Denaturierung	95 °C	20 Sekunden	30 Zyklen
Primer-Annealing	62,9 °C	20 Sekunden	
Elongation	72 °C	30 Sekunden	
Finale Elongation	72°C	3 Minuten	

**Tabelle 2.9:** Reaktionsbedingungen zur Amplifikation des 3'UTR der STK17B

Die erfolgreiche Amplifikation wurde mittels Agarose Gelelektrophorese analysiert. (Erwartete Amplikon-Länge: STK17B 3'UTR Teil 1: 1439 bp (Basenpaare), STK17B 3'UTR Teil 2: 1672 bp).

#### **Agarose Gelelektrophorese und E-BOX VX2 Geldokumentationssystem**

DNA wurde in einem 1%igen Agarose-Gel (Zusammensetzung siehe unter 2.1.5) für 40 Minuten bei 120 V aufgetrennt.

Zur Färbung der DNA diente 6 x DNA Loading Dye. Größenreferenz war GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels Sub-Cell GT Elektrophorese System. Kleine Fragmente wandern dabei in gleicher Zeit weiter als große Teilchen. Das im Gel enthaltenen Ethidiumbromid interkaliert in DNA und wird somit im E-BOX VX2 Geldokumentationssystem unter UV-Licht sichtbar.

#### **Ligation des PCR-Produkts in den StrataClone Blunt Vector**

Das PCR-Produktes (3'UTR der STK17B) besitzt glatte Enden (engl. *blunt-ends*), sodass es zunächst in einen *blunt-ended* Vektor integriert wurde. Zur Integration in einen *blunt-ended* Vektor sind keine komplementären überhängenden Enden (*sticky ends*) erforderlich. Als *blunt-ended* Vektor wurde der StrataClone Blunt Vector (pSC-B-amp/kan) gewählt. Dieser besitzt zwei *blunt-ended* DNA-Enden, welche mit *Topoisomerase I* beladen sind. Die *Topoisomerase I* übernimmt die Ligation des Vektors mit dem PCR-Produkt.

Hierzu wurden 3 µl StrataClone Blunt Cloning Buffer, 2 µl des PCR-Produkts sowie 1 µl StrataClone Blunt Vector Mix amp/kan vermischt und bei Raumtemperatur für ca. 15 Minuten inkubiert.

#### **Transformation des pSC-B-amp/kan in *E. coli* Bakterien**

Für die Transformation (d.h. Einbringung freier DNA) in *E. coli* Bakterien wurden je Ansatz 50 µl StrataClone SoloPack Competent cells eingesetzt. Nach Zugabe des ganzen Ligationsansatzes wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach ein Hitzeschock des Transformationsansatzes für 45 Sekunden bei 42 °C. Dadurch entstehen Poren in den Zellen, sodass die Plasmide in die Zellen eindringen können. Nach weiteren 2 Minuten auf Eis wurden 250 µl auf 42 °C vorgewärmtes LB- (Luria-Bertani-) Medium zugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C und 225 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agar mit Ampicillin (0,1 mg /ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Durch das auf dem Plasmid enthaltene Ampicillin-Resistenzgen überlebten nur transformierte Zellen, nicht transformierte Zellen hingegen wurden eliminiert.

### Selektion positiver Klone mittels Kolonie-PCR

Um zu überprüfen ob Ligation und Transformation erfolgreich waren, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde mit einer sterilen Pipettenspitze je eine Kolonie in 12 µl nukleasefreiem Wasser gelöst, die Pipettenspitze anschließend in einem Mikroröhrchen mit 3 ml LB-Ampicillin-Medium (100 µg/ml) abgeworfen und das Röhrchen über Nacht im Schüttler bei 37°C und 225 rpm kultiviert.

Die in Wasser gelösten Bakterien wurden bei 95°C für 10 Minuten denaturiert, anschließend wurde je Ansatz (15 µl) folgendes zugegeben:

10x Taq Puffer	1,5 µl
Primer SCB Topovektor forward	0,5 µl
Primer SCB Topovektor reverse	0,5 µl
dNTPs	0,3 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

**Tabelle 2.10:** Einfacher Reaktionsansatz zur Selektion positiver Klone

Die Reaktionsbedingungen im Thermocycler waren wie folgt:

Initiale Denaturierung	95 °C	2 Minuten	
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	35 Zyklen
Primer-Annealing	60 °C	30 Sekunden	
Elongation	72 °C	60 Sekunden	
Finale Elongation	72 °C	3 Minuten	

**Tabelle 2.11:** Reaktionsbedingungen zur Selektion positiver Klone

Der Erfolg wurde abschließend mittels Gelelektrophorese unter UV-Licht, wie oben beschrieben, verifiziert. (Erwartete Amplikon-Länge: Leervektor: 284 bp, Teil 1: 1723 bp, Teil 2: 1956 bp).

### Plasmid-DNA-Isolation mittels QIAprep Spin Miniprep

Plasmid-DNA wurde durch die QIAprep Spin Miniprep von Qiagen gewonnen. Zuvor wurden Glycerolstocks aus je 500 µl Zellsuspension und 500 µl 80%igem Glycerol bei - 80°C kryoasserviert.

2 ml gleicher Zellsuspension wurden in ein Reagenzröhrchen überführt und 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 250 µl RNase A haltigem Resuspensionspuffer P1 resuspendiert. Es wurden 250 µl Puffer P2 zugegeben und

das Reagenzröhrchen 4-6 x invertiert. Durch darin enthaltenes SDS wurden die Zellen aufgeschlossen. Durch enthaltenes NaOH entstand ein alkalisches Milieu, sodass Proteine und DNA denaturierten. 350 µl Neutralisationspuffer N3 wurden zugegeben und das Reagenzröhrchen erneut 4-6 x invertiert. Der pH-Wert wurde neutralisiert und gleichzeitig eine hohe Salzkonzentration im Reagenzröhrchen erzeugt. Dadurch konnte die kleinere Plasmid-DNA renaturieren, während größere DNA (chromosomal) sowie Proteine ausgefällt wurden. Es folgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 13'000 rpm. Der dabei entstandene Überstand (mit Plasmid-DNA) wurde auf je eine QIAprep Spin Column in einem Collection Tube pipettiert. Es wurde 1 Minute bei 13'000 rpm zentrifugiert. Dabei wurde selektiv Plasmid DNA an den Kieselsäure-Filter der QIAprep Spin Column gebunden. RNA, Zellproteine und Metabolite wurden nicht im Filter gebunden und fanden sich im Effluat. Anschließend wurde – um Endonukleasen zu entfernen – mit 500 µl Puffer PB sowie nachfolgend mit 750 µl Puffer PE gewaschen um Salze zu reduzieren und wie eben beschrieben zentrifugiert. Zuletzt wurde 1 Minute trocken zentrifugiert und die Spin Column in ein steriles 1,5 ml Reagenzröhrchen überführt. Hierin wurde mit 30 µl nukleasefreiem Wasser eluiert (Lösungen mit geringer Salzkonzentration können die DNA aus dem Filter eluieren) und nach 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur abschließend nochmals zentrifugiert.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem Nano Drop 2000, wie unter 2.2.4 beschrieben.

#### **Restriktionsverdau von pSC-B-amp/kan mit 3'UTR bzw. psiCHECK2 Leervektor**

*PmeI* und *XhoI* sind Restriktionsenzyme und schneiden DNA an spezifischen Erkennungssequenzen in Fragmente. Dadurch wurde aus dem pSC-B-amp/kan der 3'UTR ausgeschnitten und der psiCHECK2™ Vektor in der multiple cloning region äquivalent geöffnet. Die Übertragung in den psiCHECK2™ Vektor erfolgte, da hiermit weitere Untersuchungen des PCR-Produkts mittels Luciferasemessungen im Nachgang möglich sind.

Dafür wurde ein Restriktionsverdau mit je Ansatz (50 µl) 33 µl nukleasefreies Wasser, 5 µl New England Buffer 4, 0,5 µl 100 x BSA, 1,0 µl *PmeI* (10U/µl) und 0,5 µl *XhoI* (20 U/µl) sowie 10 µl (2 µg) Plasmid-DNA angesetzt. Anschließend wurden die entstandenen Fragmente durch Gelelektrophorese, wie oben beschrieben, aufgetrennt. (Erwartete Fragmentgrößen: pSC-B-amp/kan: 4,5 kb [Kilobasenpaare], 3'UTR STK17B Teil 1: 1,44 kb, 3'UTR STK17B Teil 2: 1,67 kb; psiCHECK™2-Vektor: 6,253 kb).

### **Aufreinigung mittels Wizard SV Gel and PCR Clean-Up**

Der 3'UTR STK17B sowie der geschnittene psiCHECK™2-Vektor wurden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mittels Wizard SV Gel and PCR Clean-Up von Promega aufgereinigt. Pro 10 mg ausgeschnittenem Agarose-Gel wurden 10 µl Membrane Binding Solution zugegeben. Diese löst durch enthaltenes Guanidiniumthiocyanat die DNA. Es wurde bei 56°C inkubiert, bis sich das Gelfragment vollständig gelöst hatte. Die Lösung wurde auf die SV Minicolumn in einem Collection Tube überführt und nach 1-minütiger Inkubation auf dem Filter bei Raumtemperatur für 1 Minute bei 13'200 rpm zentrifugiert. Auch hier bindet die DNA in Gegenwart von chaotropen Salzen an die Kieselsäure-Membran des Filters. Gewaschen wurde mit zunächst 700 µl, dann 500 µl Membrane Wash Solution und Zentrifugation wie eben beschrieben. Abschließend wurde 1 Minute trocken zentrifugiert. Das Effluat wurde stets verworfen. Die Elution der DNA erfolgte schließlich mit 30 µl nukleasefreiem Wasser.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am Nano Drop 2000 wie unter 2.2.4 beschrieben.

### **Ligation des 3'UTR STK17B in den PsiCHECK™-2 Vektor**

Der STK17B 3'UTR wurde mit dem PsiCHECK™-2 Vektor zum STK17B-Reporterplasmid ligiert. Dafür wurden 1 µl T4 Ligase, 1 µl T4 Ligase-Puffer, 50 ng (3 µl) psiCHECK2 Vektor und 150 ng (5 µl) STK17B 3'UTR gemischt und 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

### **Transformation des STK17B-Reporterplasmids in *E. coli* Bakterien**

Die Transformation des STK17B-Reporterplasmid in *E.coli* Bakterien erfolgte wie oben beschrieben. Einziger Unterschied war vor Zugabe des Ligationsansatzes eine 10-minütige Inkubation der kompetenten Zellen mit 2 µl Mercaptoethanol.

Durch das auf dem psiCHECK™-2 Vektor enthaltene Ampicillinresistenzgen wurden auch hier transformierte Zellen durch im LB-Agar enthaltenes Ampicillin selektioniert.

Die Selektion positiver Klone, das Anlegen von Glycerolstocks sowie die Plasmid-DNA-Isolation erfolgten wie oben beschrieben. Hierbei wurden bei der PCR als Primer psiCheck forward und psiCheck reverse eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese unter UV-Licht beurteilt. (Erwartete DNA-Größe: STK17B-Reporterplasmid Teil 1: 2170 bp, STK17B-Reporterplasmid Teil 2: 2403 bp, psiCHECK™-2 Vektor (leer): 731 bp).

### **Test-Restriktionsverdau sowie Sequenzierung des STK17B-Reporterplasmids**

STK17B-Reporterplasmid-DNA wurde mittels folgendem Restriktionsverdau auf die erfolgreiche Integration des STK17B-3'UTRs überprüft: Hierfür wurden je Ansatz (15 µl) 9,5 µl nukleasefreies Wasser, 1,5 µl 10x New England Buffer 4, 0,5 µl *PmeI* (10U/µl) und 0,25 µl *XhoI* (20 U/µl), 0,25 µl 100 x BSA sowie 3 µl Plasmid-DNA eingesetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Es wurde eine Gelelektrophorese, wie oben beschrieben, durchgeführt. Der durch Miniprep gewonnene STK17B-Reporterplasmid wurde zur Sequenzierung zu Eurofins MWG GmbH, Ebersberg geschickt, um die Sequenz zu verifizieren.

### **DNA-Isolation mittels PureYield™ Plasmid Midiprep System**

Das PureYield™ Plasmid Midiprep System ermöglicht es höhere DNA-Konzentrationen durch Verwertung größerer Zellzahlen zu erzielen. Dafür wurden Zellen aus dem zuvor angelegten Glycerolstock unter Anschütteln vermehrt: über den Tag in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (0,1 µg/ml) bei 225 rpm und 37 °C, über Nacht 1 ml davon weiter in 100 ml LB-Medium mit 100 µl Ampicillin bei 150 rpm und 37 °C.

Die Zellen wurden bei 5000 x g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in 6 ml Cell Resuspension Solution (enthält RNase) resuspendiert und zusammengeführt. Die Zellen wurden nun durch Zugabe von 6 ml Cell Lysis Solution (enthält NaOH, SDS) und 5 x Invertieren lysiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 3 Minuten wurden 10 ml Neutralization Solution zugegeben und 10 x invertiert. Der hierbei durch die Neutralisation ausfallende Niederschlag wurde durch Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 15 000 x g für 15 Minuten von der die Plasmid-DNA enthaltenden Lösung getrennt.

Die DNA-Aufringung erfolgte mit Hilfe der Clearing Column und Binding Column von Promega durch Vakuumfiltration. Der durch o.g. Zentrifugation entstandene Überstand wurde dazu auf die Clearing Column pipettiert, welche zuvor auf die Binding Column gesteckt wurde und anschließend Vakuum angelegt bis alle Flüssigkeit filtriert wurde. Die DNA wurde dabei in der Binding Column durch die Kieselsäure-Membran gebunden, die Clearing Column nachfolgend verworfen. 5 ml Endotoxin Removal Wash wurden zur Entfernung von RNA, Proteinen und Endotoxinen auf die Binding Column pipettiert, Vakuum wurde angelegt. Salze wurden durch 20 ml Column Wash Solution ausgewaschen. und erneut Vakuum angelegt bis der Filter trocken war.

Zum Eluieren wurden 400 µl nuklease freies Wasser auf die Binding Column gegeben und die Plasmid-DNA mittels Vakuum in einem steriles 1,5 ml Reagenzröhrchen aufgefangen.

Die DNA-Konzentration wurde wie unter 2.2.4 beschrieben mit dem Nano Drop 2000 bestimmt.

## 2.2.8 Gerichtete Mutagenese der premiR-93 Bindestellen im STK17B-Reporterplasmid

Sequenzen im STK17B-Reporterplasmid, die als Bindestellen der premiR-93 vorhergesagt wurden, wurden mit dem QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit mutiert. An jeder der 4 angenommenen Bindestelle wurden separat während der PCR durch entsprechende Mutationsprimer (Sequenz siehe Tabelle 2.1) je 2 Basen ausgetauscht. Dabei bestand ein einfacher PCR-Ansatz (50 µl) aus Folgendem:

10 x Reaktionspuffer	5 µl
STK17B-Reporterplasmid	100 ng
Mutationsprimer 1- 4 STK17B forward (Sequenzen siehe Tabelle 2.1)	1,25 µl (125 ng)
Mutationsprimer 1- 4 STK17B reverse (Sequenzen siehe Tabelle 2.1)	1,25 µl (125 ng)
dNTP mix	1µl
QuikSolution Reagent	1,5 µl
nukleasefreies Wasser	auffüllen auf ein Endvolumen von 50 µl

**Tabelle 2.12:** Einfacher Reaktionsansatz zur Mutagenese der miR-93 Bindestellen im STK17B 3'UTR

Zusätzlich wurde 1 µl QuikChange Lightning Enzyme zugegeben. Die Reaktionsbedingungen im Thermocycler waren wie folgt:

Initiale Denaturierung	95 °C	2 Minuten	
Denaturierung	95 °C	20 Sekunden	18 Zyklen
Primer-Annealing	60 °C	10 Sekunden	
Elongation	68 °C	30 Sekunden/kb des Plasmids STK17B-Reporterplasmid Teil 1: 7,74 kb, STK17B-Reporterplasmid Teil 2: 7,97 kb	
Finale Elongation	68 °C	5 Minuten	
Final hold	4 °C		

**Tabelle 2.13:** Reaktionsbedingungen zur Mutagenese der miR-93 Bindestellen im STK17B 3'UTR

### ***DpnI*-Verdau der parenteralen DNA**

Im Anschluss wurde durch Zugabe von 2 µl der Endonuklease *DpnI* und Inkubation für 15 Minuten bei 37°C die nicht mutierte Plasmid-DNA verdaut. *DpnI* ist spezifisch für (hemi)methylierte DNA. DNA aus hier verwendeten *E.coli* Bakterien (XL10-Gold) ist dam methyliert (d.h. die DNA ist am Adenin methyliert) und wird somit von *DpnI* abgebaut.

### **Transformation von mutierten STK17B-Reporterplasmiden in XL 10-Gold Ultracompetent Cells**

Die Transformation der mutierten STK17B-Reporterplasmide (Mut 1-4) (Sequenz der Mutationsprimer siehe Tabelle 2.1) erfolgte in XL 10-Gold Ultracompetent Cells. Je Ansatz wurden 45 µl XL 10 Gold Zellen in ein Mikrobiologieröhrchen gegeben, 2µl XL-Gold Mercaptoethanol zugegeben und nach Schütteln für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Es wurden nun je 10 µl *DpnI*-behandelte DNA eines mutierten Reporterplasmids zugefügt und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Hieraufhin erfolgte ein Hitzeschock der Zellen für 30 Sekunden bei 42°C, die Zellen erneut für 2 Minuten auf Eis inkubiert und 500 µl vorgewärmtes LB-Medium/Röhrchen zugefügt. Inkubiert wurde nun für 1 Stunde bei 37°C und 225 rpm im Schüttler. Daraufhin wurden die gesamten Zellen auf LB-Agar mit Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Hier fand ebenfalls die beschriebene Selektion durch Ampicillinresistenz statt.

Klone wurden mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und diese in 3 ml LB-Amp-Medium angeschüttelt. Hieraus wurden gleichfalls Glycerolstock und Miniprep angefertigt sowie eine Sequenzierung der mutierten Plasmid-DNA durch Eurofins MWG GmbH, Ebersberg durchgeführt.

### **2.2.9 Luciferase-Messung mittels Dual-Glo™ Luciferase Assay System**

Der psiCHECK2 Vektor besitzt die Gensequenzen für 2 Luciferasen: die Renilla Luciferase upstream des 3'UTR und die Firefly Luciferase downstream des 3'UTR. Bei der Transkription werden das Renilla Luciferase Gen und der 3'UTR aufgrund ihrer Lage auf dem Plasmid gemeinsam umgeschrieben. In Gegenwart einer an den 3'UTR bindenden premiR-93 (durch Transfektion eingebracht) wird das gemeinsame Transkript degradiert und die Renilla-Luciferase Aktivität verringert. Die Firefly Luciferase wird unabhängig vom Transkript exprimiert, sodass deren Aktivität nur von der Transfektionseffizienz abhängig ist. Die Luciferase-Aktivität (Renilla- bzw. Firefly-Luciferase) wurden bei Raumtemperatur mittels Dual-Glo™ Luciferase Assay System sowie dem Lumat LB 9507, einem Luminometer, bestimmt.



Dazu wurden HEK-Zellen mit premiR-93 und den gewonnenen STK17B-Reporterplasmiden (nicht mutiert bzw. mutiert), wie unter 2.2.3 beschrieben, ko-transfiziert und inkubiert. Die Zellen wurden je in ein 2 ml Reagenzröhrchen überführt, mit je 1 ml HBSS nachgespült und 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in je 30  $\mu$ l HEK-Medium resuspendiert. 15  $\mu$ l der Zellsuspension wurden in ein neues, Luminometer-Röhrchen überführt.

Es wurden je 15  $\mu$ l Dual-Glo Luciferase Reagenz zugegeben (lysiert Zellen, Substrat für Firefly Luciferase) und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte die erste Messung (Messung der Firefly-Luciferase-Aktivität). Anschließend wurden 15  $\mu$ l des 1 : 100 mit dem Stop and Glo-Puffer verdünnten Stop and Glo zugegeben (stoppt Firefly-Luciferase-Aktivität, Substrat für Renilla-Luciferase) und erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte die zweite Messung (Messung der Renilla-Luciferase-Aktivität).

## **2.2.10 Proteinbestimmung**

### **Gewinnung von Proteinextrakten**

Proteinextrakte wurden aus primären, mit premiR-93, siSTK17B oder jeweiliger Negativkontrolle transfizierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gewonnen. Die Zellen wurden bei 2000 rpm 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Im Folgenden wurden die Zellen in 300  $\mu$ l eiskaltem 1x Cell Lysis Buffer mit 1 x Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail lysiert. Nach zweimaligem Vortexen für 30 Sekunden und zwischenzeitlich 30 Sekunden Inkubation auf Eis, folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Der Überstand (Zellextrakt) wurde nach abschließender Zentrifugation mit 15'000 rpm bei 4°C für 10 Minuten je in ein neues Reagenzröhrchen überführt.

### **BCA-Assay- Konzentrationsbestimmung von Zellextrakten**

Mittels BCA-Assay (BCA= Bicinchoninic Acid) wurde die Konzentration der Zellextrakte als Duplikate bestimmt. Dazu wurde eine Albumin-Verdünnungsreihe angesetzt (2- 1- 0,5- 0,24- 0,125- 0 mg/dl). Hiervon, bzw. vom Proteinextrakt, wurden je 10  $\mu$ l in ein Well einer durchsichtigen 96 Well Platte pipettiert. Die BCA-Reagenzien A (enthält u.a. BCA) und B (enthält u.a. 4 %-iges CuSO<sub>4</sub>) wurden im Verhältnis Reagenz A:B von 50:1 verdünnt und hiervon 200  $\mu$ l/Well zugegeben. In der sogenannten Biuret Reaktion wird in alkalischem Milieu durch Proteine Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup> reduziert. Nachfolgend bilden zwei Moleküle BCA mit einem Molekül Cu<sup>1+</sup> einen violetten Farbstoff. Dazu wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mittels Elisa-Reader die Proteinkonzentration durch photometrische Messung der Absorption des violetten Farbstoffs bei 560 nm bestimmt.

### **SDS-Gelelektrophorese**

Für die SDS-Gelelektrophorese wurde ein SDS-Polyacrylamidgel aus Trenn- und einem Sammelgel (Zusammensetzung siehe 2.1.5) in einem Gießstand (Biorad) gegossen.

Zu den Proben wurde ein 5x SDS-Probenpuffer (Zusammensetzung siehe 2.1.5) zugegeben. Die Proben wurden 3 Minuten auf 95 °C erhitzt um Disulfidbrücken zu spalten und Protein-Monomere herzustellen. Das zuvor gegessene SDS-Polyacrylamidgel wurde mit je 10 µg Protein/ Tasche beladen und konstant 30 mA bei maximal 300 V für 1,5 h angelegt. Dadurch wurden die Proteine der Größe nach aufgetrennt.

### **Westernblot**

Durch den Westernblot wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (aus Polyvinylidenfluorid, Porengröße 0,45 µm; 15 Minuten vorher in Methanol inkubiert) übertragen. Dafür wurde ein „Sandwich“ umgeben von Transferpuffer (Zusammensetzung siehe 2.1.5) vorbereitet: kathodenseitig wurden in folgender Reihenfolge ein Schwamm, Filterpapier, die PVDF-Membran, das Trenngel nach der Elektrophorese, ein weiteres Filterpapier und noch ein Schwamm angeordnet. Es wurden für 1,5 Stunden konstant 60 V (30 V pro Gel) bei maximal 300 mA angelegt.

### **Immunodetektion**

Zur Immunodetektion wurde die PVDF-Membran, auf die nun das Protein übertragen worden war, eine Stunde in Blockpuffer (5 % Magermilch in PBST) inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Der Blockpuffer wurde nachfolgend verworfen und die Primärantikörper gegen die zu untersuchenden Proteine, gelöst in 1 % Magermilch in PBST, zugegeben.

Es wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Primärantikörper waren DRAK2-Antikörper (Größe 43 kDa, monoklonaler Rabbit IgG gegen die STK17B, 1:1000 verdünnt) und der β-Aktin-Antikörper (Größe 42 kDa, monoklonaler Mouse IgG, 1:60000 verdünnt). Aufgrund der sehr ähnlichen Größe wurde zunächst die Immunodetektion für DRAK2 und, nach Strippen der Membran mit Stripping Buffer (Zusammensetzung siehe 2.1.5), die Detektion von β-Aktin durchgeführt.

Am nächsten Tag wurde die Membran 30 Minuten mit 1 % Magermilch in PBST gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen.

Anschließend wurde die Membran erneut in 1% Magermilch in PBST mit dem Sekundärantikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Sekundärantikörper waren der Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antikörper (bindet an den DRAK 2-Antikörper, 1:2'000

verdünnt) und der Anti-Mouse IgG HRP-linked Antikörper (bindet an den monoklonalen  $\beta$ -Aktin-Antikörper (AC-15), 1:10'000 verdünnt). Sie tragen beide die Merrettich-Peroxidase (HRP).

Der Sekundärantikörper wurde verworfen und die Membran dreimal für je 10 Minuten in PBST gewaschen, damit anschließend nur noch an Protein gebundene Antikörper vorhanden waren. Nach Abtropfen der Membran wurden 20X LumiGLO®Reagent (enthält Luminol) und 20X Peroxide 1:5 verdünnt auf die Membran gegeben. In Anwesenheit von Peroxid ( $H_2O_2$ ) wurde Luminol von der HRP oxidiert. Dadurch entsteht Chemilumineszenz, welche auf einem Röntgenfilm (durch Autoradiographie) detektiert werden kann.

### **2.2.11 Arbeiten mit dem Attune® Acoustic Focusing Cytometer**

Das Attune® Acoustic Focusing Cytometer ist ein Durchflusszytometer. Die Zellen werden hier durch Ultraschall einzeln aufgereiht und intern mittels Laserlicht und Photodetektoren untersucht. Aufgrund von Vorwärtsstreuung (axial zum einfallenden Laserlicht, engl. forward-scattering bzw. FSC) kann die Größe, aufgrund von Seitwärtsstreuung ( $90^\circ$  zum einfallenden Laserlicht, engl. side scattering bzw. SSC) die Granularität von Zellen ermittelt werden und somit verschiedene Zelltypen unterschieden werden. Werden der Zellsuspension zuvor Fluoreszenzfarbstoffe zugegeben, so können nach Anregung mit Licht (405nm, 488 nm oder 638nm) zusätzliche Eigenschaften der Zellen (in nachstehend beschriebenen Versuchen ausgenutzt) untersucht werden. Das Emissionsspektrum des dabei entstehenden Fluoreszenzlichts kann durch entsprechende Filter in bis zu 6 Fluoreszenzkanälen untersucht werden <sup>[14]</sup>.

#### **Apoptoseversuche mit „Violet Chromatin Condensation/Dead Cell Apoptosis Kit with Vybrant® DyeCycle™ and SYTOX® AADvanced™ for Flow Cytometry“**

Durch das Violet Chromatin Condensation/Dead Cell Apoptosis Kit wird Chromatin angefärbt. Das kondensierte Chromatin apoptotischer Zellen wird durch das zellgängige Vybrant® DyeCycle stärker gefärbt, als das Chromatin normaler Zellen. SYTOX® AADvanced™ dringt aufgrund der Membranintegrität nur in nekrotische Zellen ein und färbt diese an. In der Durchflusszytometrie mittels Attune® Acoustic Focusing Cytometer konnten somit mittels Fluoreszenz Analyse der Anteil apoptotischer, nekrotischer und lebender Zellen bestimmt werden.

Es wurden dazu  $CD4^+$ -T-Zellen wie unter 2.2.2 beschrieben, isoliert und je 2 Mio. Zellen/Well mit miR-93 bzw. siSTK17B oder entsprechender Negativkontrolle transfiziert (6 Well Platte). 5 Stunden nach Transfektion wurde mit CD3/CD28 stimuliert und für weitere 24 Stunden inkubiert.

Ca. 500 000 Zellen wurden für die Apoptosemessung verwendet. Diese wurden mit HBSS durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 Minuten gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml HBSS resuspendiert. Um die Stimulations-Beads zu entfernen, wurden die Reagenzröhrchen für eine Minute in einen Magneten gestellt und der Überstand wurde in ein neues Reagenzröhrchen überführt. Als nächstes folgte die erneute Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml HBSS mit 0,2 µl Vybrant DyeCycle Violet stain (1µM) und 1µl SYTOX AADvanced DMSO Lösung (500 µM) resuspendiert und für 30 unter Lichtausschluss inkubiert.

Das Vybrant® DyeCycle™ wurde mit dem Exzitationslaser mit 405 nm angeregt und mit dem Detektor VL1 (Emissionsspektrum 450/40 nm) gemessen. Der Fluoreszenzfarbstoff Sytox wurde mit dem Exzitationslaser mit 488 nm angeregt, die Fluoreszenz mit dem Detektor BL3 (Emissionsspektrum v90/50 nm) bestimmt.

### **Bestimmung der Transfektionseffizienz mit Cy-3 markierter premiR**

Um die Transfektionseffizienz von T-Zellen zu bestimmen, wurden diese nach Isolation mit Cy3-markierter premiR transfiziert und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in ein Reagenzröhrchen überführt, 5 Minuten bei 2800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und in 1 ml HBSS resuspendiert. Danach konnte am Attune® Acoustic Focusing Cytometer mit dem Exzitationslaser mit 405 nm und dem Detektor BL2 (Emissionsspektrum 574/26 nm) die Transfektionseffizienz im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt werden.

## **2.3 Statistik**

Zur Auswertung des TaqMan wurde je der Mittelwert der Gruppe von Sepsispatienten (n= 10) und in der Gruppe gesunder Probanden (n= 6) gebildet, Standardabweichung und Z-Score ermittelt. Der Wert der Gruppe von Sepsispatienten wurde anschließend in Relation zum Wert der gesunden Versuchsgruppe gestellt.

Analog wurde zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression, wie auch zur Bestimmung der relativen miRNA-Expression (Mittelwerte der qPCR einer Serie von mit premiR-93 oder siSTK17B transfizierten Zellen prozentual bezogen auf die jeweilige Negativkontrolle; nachfolgend Bildung eines gemeinsamer Mittelwertes der relativen miRNA-Expression aller Versuchsserien).

Zur Beurteilung der Güte der Daten wurde je die Standardabweichung berechnet.

Anschließend erfolgte eine Signifikanzprüfung auf dem 5 % Niveau mit dem *Mann-Whitney-U-Test*, um die gefunden Unterschiede qualitativ zu validieren. Als Nullhypothese wurde

gesetzt, dass sich die beiden Vergleichsgruppen nicht unterscheiden, Alternativhypothese ist, dass sich die beiden Versuchsgruppen unterscheiden.

Das Ergebnis galt bei einem zweiseitigen Test auf dem 5%-Niveau signifikant, wenn der  $|Z\text{-Score}| \geq 1,960$  ist.

Bei durch Westernblot erhaltenen Bildern wurden die Intensitätsunterschiede auf Röntgenfilmen interpretiert (stärkere Schwärzung des Röntgenfilms bzw. breitere Banden auf den Filmen bedeuten mehr Belichtung / Fluoreszenz/Protein an diesen Stellen).

Nach Messung der Luciferaseaktivitäten wurde je die Renilla-Luciferase-Aktivität auf die Firefly-Luciferase-Aktivität normiert um unterschiedliche Transfektionseffizienzen auszugleichen. Negativkontrollen wurden als 100% gesetzt, der Wert der mit siSTK17B transfizierten Zellen darauf bezogen. Es wurden auch hier der Mittelwert, die Standardabweichung und der Z-Score der Versuchsgruppen bestimmt.

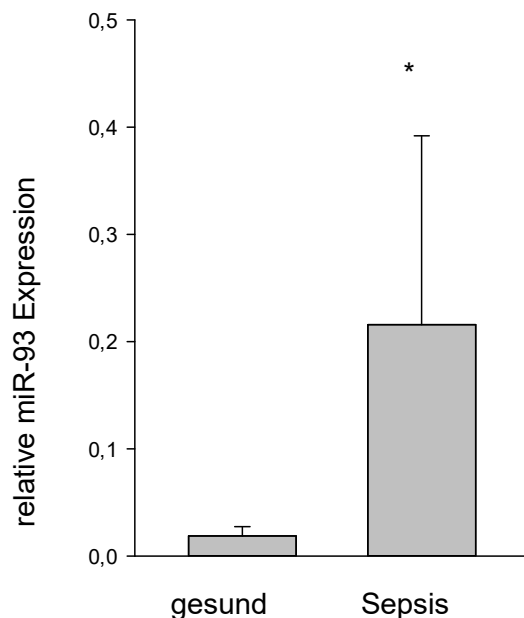
Die Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet und entsprechende Grafiken dazu hiermit erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Expression von miR-93 ist in T-Zellen von Sepsispatienten gesteigert

Um die im Microarray gefundene gesteigerte Expression der miR-93 zu validieren, wurde die miR-93-Expression in nativen PanT-Zellen einer weiteren Gruppe von Sepsispatienten bzw. von gesunden Probanden nach reverser Transkription mittels real-time PCR bestimmt.

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, wird die miR-93 bei Sepsispatienten im Vergleich zur Gruppe der gesunden Probanden um das 11,4 fache stärker exprimiert (Sepsis  $0,22 \pm 0,17$ , gesunde Probanden  $0,02 \pm 0,01$ ,  $p < 0,01$ ).

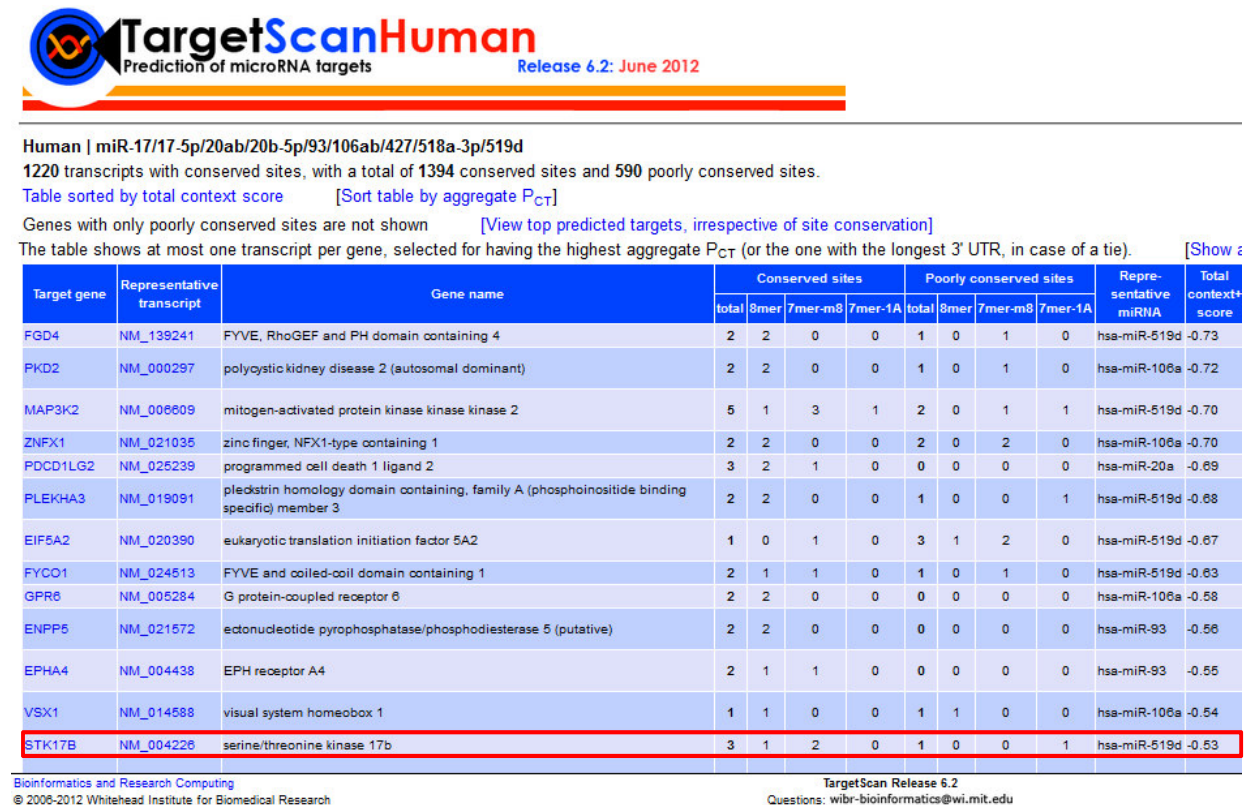


**Abbildung 3.1: Gesteigerte miR-93-Expression in PanT-Zellen bei Sepsispatienten im Vergleich zu gesunden Probanden.**

Die miR-93 Expression wurde mittels qPCR bestimmt. Dargestellt ist die relative miR-93 Expression von Sepsisprobanden (n=10) versus gesunden Probanden (n=6) als Mittelwert  $\pm$  SD, \*  $p < 0,01$ .

### 3.2 *In silico*-Analyse zeigt STK17B als potentiell Zielgen der miR-93

Um zu untersuchen, welche funktionelle Relevanz die gefundene Expressionssteigerung haben könnte, wurde *in silico* mittels der Software TargetScan analysiert, welche immunologisch relevanten Zielgene potentiell von der miR-93 reguliert werden könnten (Abbildung 3.2).



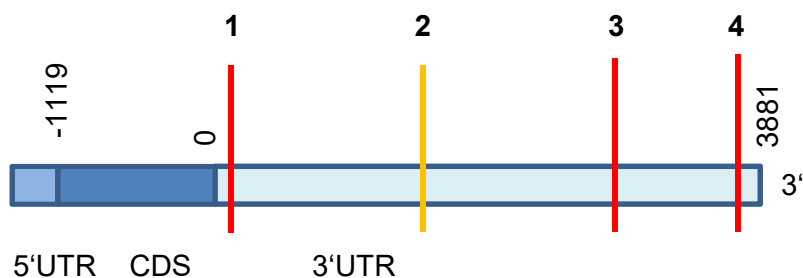
**Abbildung 3.2: Evaluation potentieller Zielgene der miR-93 durch TargetScan.** Dargestellt sind durch TargetScan vorgeschlagene potentielle Zielgene der miR-93, sortiert nach dem „Total context+ score“ in absteigender Reihenfolge. Rot markiert das Ergebnis für die Serin Threonin Kinase 17B (STK17B)

Die Software TargetScan berechnet zur Klassifizierung potentieller Zielgene einen „Total context+ score“. Der „Total context+ score“ stellt einen Gesamtfaktor dar, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Zielgen reguliert wird. Er berechnet sich aus der Summe von sechs Faktoren, der „site-type contribution“, „3' pairing contribution“, „local AU contribution“, „position contribution“, „target site abundance (TA) contribution“ und der seed-pairing stability (SPS) contribution“<sup>[19]</sup>. Für jedes Zielgen werden je Bindestelle einzelne „context+“

scores“ berechnet, aus deren Summe sich der der „Total context+ score“ ergibt. Je negativer der Wert des „total context+ scores“, desto wahrscheinlicher ist eine Bindung der miR-93 an das Zielgen.

Aus der Gruppe der potentiellen Zielgene mit den höchsten „Total context+ scores“ wurde die *Serin-Threonin-Kinase 17 B (STK17B)* als zu untersuchendes Zielgen der miR-93 ausgewählt. Für die STK17B ist in der Literatur eine Rolle der *STK17B* bei Apoptose <sup>[46]</sup> sowie ein Einfluss auf T-Lymphozyten <sup>[20, 48]</sup> beschrieben. Damit ist die STK17B in Zusammenhang mit Sepsis ein interessantes potentielles Zielgen.

Der 3' UTR der *STK17B* weist vier potentielle Bindestellen für die miR-93 auf (Abbildung 3.3, Tabelle 3.1).



**Abbildung 3.3 Schematische Darstellung der Bindestellen der miR-93 im 3'UTR der *STK17B* mRNA**

Die Abbildung zeigt schematisch die mRNA der *STK17B* mit den Bindestellen 1-4. Im hellblau unterlegten 3'UTR sind rot die evolutionär konservierten (conserved) und orange eine evolutionär weniger konservierten (poorly conserved) Bindestelle für die miR-93 markiert. Die kodierende Sequenz (CDS) ist dunkelblau unterlegt. Die vertikal geschriebenen Zahlen geben den Abstand vom CDS Stop Codon in Basenpaaren an.

	hsa-miR-93	3' GAUGGACGUGCUUGUC <b>GUGAAAC</b>
1	<i>STK17B</i> 3'UTR 103-109	5' ...GUUUUAU <b>UUGUAAAUGCACUUUU</b> ...
(2)	<i>STK17B</i> 3'UTR 1442-1448	5' ...GAAUAACUAUCAGGUC <b>CACUUUAU</b> ...
3	<i>STK17B</i> 3'UTR 2836-2840	5' ...AGUGAAA <b>UUGUAAUGGCACUUUA</b> ...
4	<i>STK17B</i> 3'UTR 3722-3728	5' ...GCUAAAA <b>UUAAAAAGCACUUUU</b> ...

**Tabelle 3.1: Bindestellen der hsa-miR 93 im 3'UTR der *STK17B* mRNA**

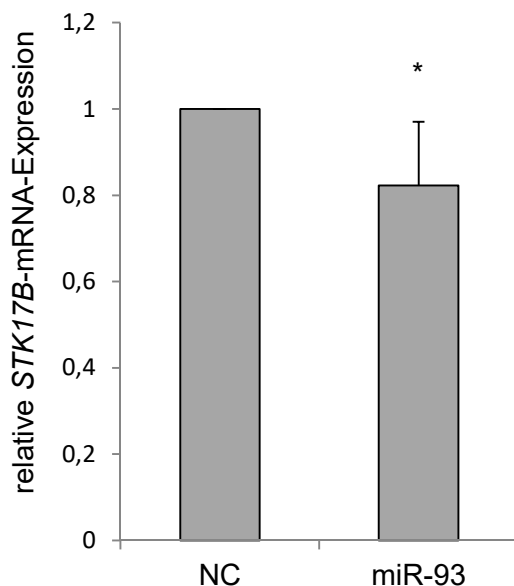
In der Tabelle sind die Sequenz der hsa-miR-93 sowie die komplementären Sequenzen der potentiellen Bindestellen für die miR-93 im 3'UTR der *STK17B* (hervorgehoben) und deren Lage im 3'UTR (Abstand zum CDS Stop Codon) angegeben.



### 3.3 Transfektion von premiR-93 in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen reduziert die *STK17B* mRNA-Expression

Um experimentell zu untersuchen, ob die *STK17B* tatsächlich ein Zielgen der miR-93 ist, wurde zunächst die mRNA-Expression nach Transfektion von premiR-93 in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gesunder Probanden untersucht. Da primäre T-Zellen nur schwer transfizierbar sind, wurde zunächst die Transfektionseffizienz bestimmt. Nach Transfektion einer Cy3-markierten premiR zeigte sich durchflusszytometrisch eine Transfektionseffizienz von 30-50 %.

Die Transfektion von miR-93 in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen führte, wie in Abbildung 3.4 dargestellt, trotzdem zu einer signifikant verminderten *STK17B* mRNA Expression im Vergleich zur Negativkontrolle (CD4<sup>+</sup> T-Zellen  $0,82 \pm 0,15$ ,  $n=10$ ,  $p < 0,01$ ). Dies weist darauf hin, dass die mRNA-Expression der *STK17B* durch die miR-93 reguliert wird.



**Abbildung 3.4 Regulation der *STK17B*-Expression nach Transfektion mit miR-93 versus Negativkontrolle (NC).**

Aus EDTA-Vollblut gesunder Probanden wurden primäre CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch Negativselektion gewonnen. Hieraus wurde RNA extrahiert und nach reverser Transkription mittels qPCR die *STK17B* mRNA-Expression bestimmt. Dargestellt ist die relative *STK17B* mRNA-Expression nach Transfektion mit miR-93 vs. der Negativkontrolle (NC) als Mittelwert  $\pm$  SD ( $n=10$ ),  $*p<0,01$ .

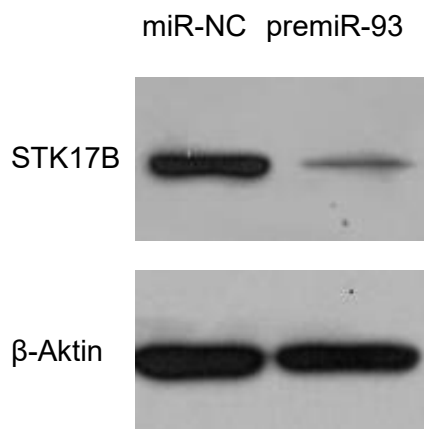
### 3.4 Transfektion von premiR-93 führt zu einer verminderten STK17B-Proteinexpression in primären CD4<sup>+</sup>T-Zellen

Ein möglicher Einfluss der miR-93 auf die STK17B-Proteinexpression wurde mit Hilfe von Western Blot-Analysen untersucht.

Dazu wurden primäre CD4<sup>+</sup> T-Zellen gesunder Probanden mit synthetischer premiR-93 transfiziert. Als Kontrolle dienten von den gleichen Probanden gewonnene CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche in gleicher Weise behandelt und mit einer miR-Negativkontrolle transfiziert wurden.

Hieraus wurde Gesamt-Protein extrahiert und mittels BCA-Assay die Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend wurde ein Westernblot mit gleichen Mengen Gesamt-Protein durchgeführt.

Bei Transfektion von premiR-93 zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle eine geringere Expression von STK17B-Protein (Abbildung 3.5). Dies bestätigt, dass die STK17B-Expression auch auf Proteinebene durch die miR-93 reguliert wird.



**Abbildung 3.5: STK17B-Proteinexpression in primären T-Lymphozyten nach Transfektion mit miR-93**

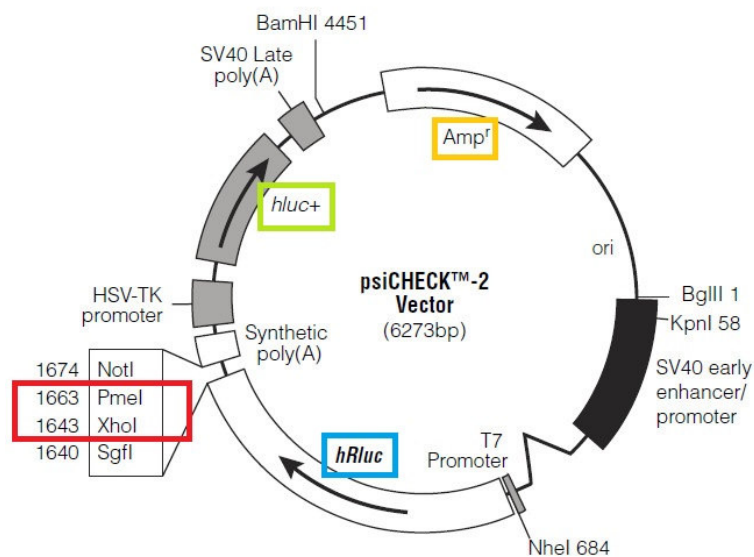
Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot (n= 3 Einzelversuche). Gleiche Mengen Protein wurden jeweils mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es zeigte sich eine geringere STK17B-Proteinmenge nach miR-93-Transfektion im Vergleich zur Negativkontrolle.

### 3.5 Regulation der *STK17B* wird über direkte Bindung der miR-93 an Bindestellen im 3'UTR der *STK17B* mRNA vermittelt

Um zu überprüfen, ob bei der Regulation der *STK17B* mRNA durch die miR-93 ein direkter oder indirekter Effekt vorliegt, wurde ein dualer Luciferase-Reportergen-Assay durchgeführt. Hierzu wurde der 3'-UTR der *STK17B* mittels PCR amplifiziert und nachfolgend in die Multiple Cloning Site des Expressionsvektors psiCHECK™-2 Vektor kloniert (Abbildung 3.6). Hierdurch kann die Interaktion zwischen miRNA und Bindestellen im 3'UTR in einem unabhängigen System untersucht werden. Mittels Sequenzanalyse wurde das erstellte Vektorkonstrukt verifiziert.

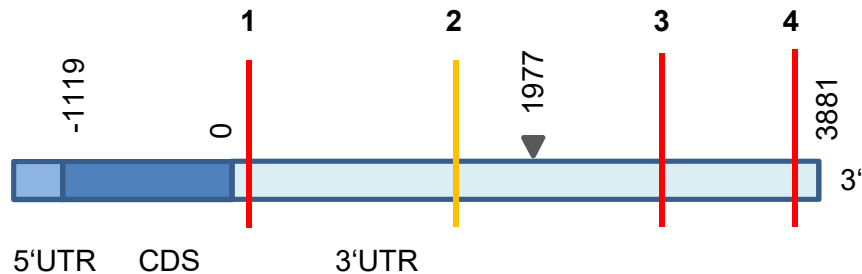
Der Vektor codiert für zwei Luciferasen (Renilla, Firefly). Die Firefly-Luciferase wird konstant exprimiert und zur Normalisierung der Transfektionseffizienz verwendet. Die Renilla Luciferase ist mit dem einklonierten 3'UTR fusioniert und damit, im Falle einer direkten Bindung der miR-93 an den 3'UTR, durch die miRNA regulierbar.

Hierüber kann die direkte miRNA-Bindung an die Bindestellen nachgewiesen werden.



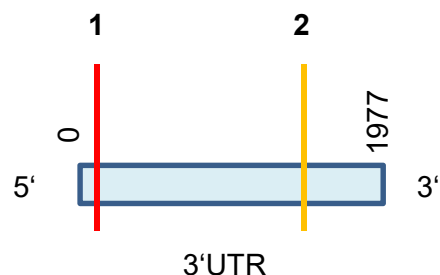
**Abbildung 3.6: Graphische Charakterisierung der Reporterplasmide.** Genkarte des psiCHECK™-2 Vektors: Rot markiert ist die Multiple Cloning Site mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *PmeI* und *XhoI*. Hier wird je Teil 1 bzw. 2 des 3'UTRs der *STK17B* in den Vektor ligiert. Grün ist die Firefly Luciferase (*hLuc+*), blau die Renilla Luciferase (*hRluc*) und orange die Ampicillinresistenz (*Amp<sup>r</sup>*) gekennzeichnet.

Um die Klonierung des 3'UTR der *STK17B* zu erleichtern, wurde der 3881 Basenpaare große 3'UTR in 2 Teile aufgeteilt (Abbildung 3.7). Die Teile wurden nachfolgend getrennt kloniert.



**Abbildung 3.7 Schematische Darstellung der *STK17B*-mRNA mit den Bindestellen 1- 4.** Rot markiert die evolutionär konservierten (conserved), orange eine weniger konservierte (poorly conserved) Bindestelle für die miR-93. Der Pfeil markiert im 3'UTR die Trennungsstelle bei der Klonierung in Teil 1 (*STK17B(1)*) und Teil 2 (*STK17B(2)*) des 3'UTRs. Die kodierende Sequenz (CDS) ist dunkelblau unterlegt. Die vertikal geschriebenen Zahlen geben den Abstand vom CDS Stop Codon in Basenpaaren an.

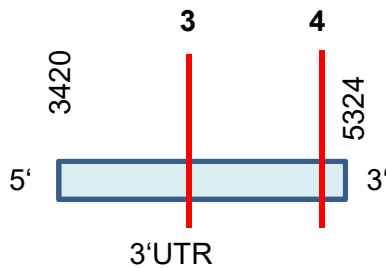
Der erste Teil des 3'UTRs ist 1977 Basenpaare lang und befindet sich auf der 5' Seite des 3'UTRs der *STK17B* (Abbildung 3.8). Er wird nachfolgend *STK17B(1)* genannt. Das Reporterplasmid *STK17B(1)* enthält zwei Bindestellen für die miR-93, bezeichnet mit Bindestelle 1 und 2. Bindestelle 1 wurde von Target Scan als eine konservierte Bindestelle (conserved), Bindestelle 2 als eine weniger konservierte Bindestelle (poorly conserved) vorhergesagt.



**Abbildung 3.8 Schematische Darstellung des 5'-seitigen Anteils des *STK17B* 3'UTRs mit Bindestelle 1 und 2**

Rot markiert die konservierte (conserved), orange die weniger konservierte (poorly conserved) Bindestelle für die miR-93. Die vertikal geschriebenen Zahlen geben den Abstand vom CDS Stop Codon in Basenpaaren an.

Der zweite Teil des 3'UTRs ist 1904 Basenpaare lang und befindet sich auf der 3' Seite des 3' UTRs (Abbildung 3.9). Er wird nachfolgend *STK17B(2)* genannt. Das Reporterplasmid *STK17B(2)* enthält ebenfalls zwei Bindestellen für die miR-93 bezeichnet mit Bindestelle 3 und 4. Beide Bindestellen werden von TargetScan als konservierte Bindestellen (conserved) vorhergesagt.



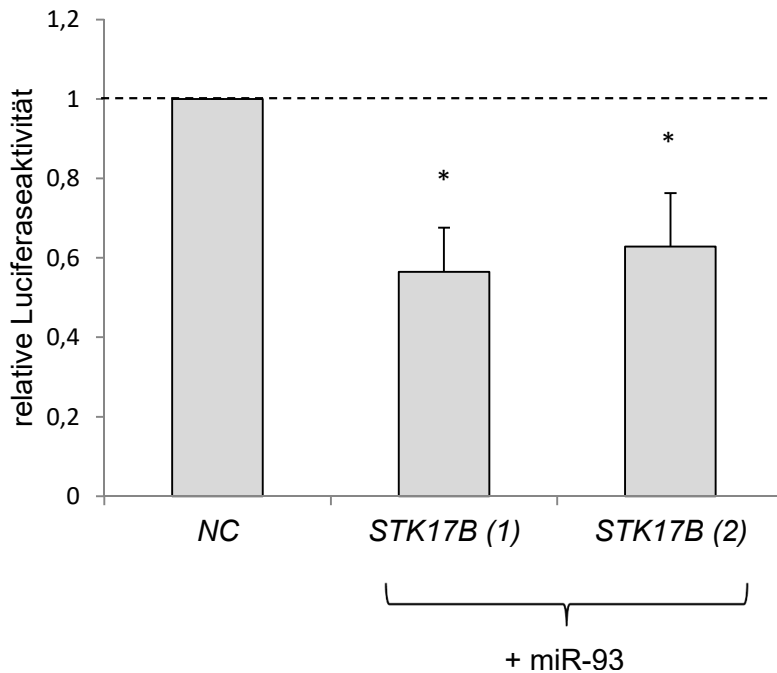
**Abbildung 3.9 Schematische Darstellung des 3'-seitigen Anteils des *STK17B* 3'UTRs mit den Bindestellen 3 und 4**

Rot markiert die konservierten (conserved) Bindestellen für die miR-93. Die vertikal geschriebenen Zahlen geben den Abstand vom CDS stop in Basenpaaren an

Die Reporterplasmide wurden zusammen mit premiR-93 in HEK-Zellen co-transfiziert.

In der luminometrischen Messung der Luciferaseaktivitäten zeigte sich bei Ko-Transfektion von *STK17B(1)*-Reporterplasmid mit premiR-93 im Vergleich zur Ko-Transfektion mit miRNA-Negativkontrolle eine signifikante relative Abnahme der Renilla-Luciferaseaktivität auf 56 % ( $0,56 \pm 0,11$ ,  $p < 0,01$ , Abbildung 3.10). Bei Ko-Transfektion von *STK17B(2)*-Reporterplasmid mit premiR-93 zeigte sich im Vergleich zur Ko-Transfektion mit miR-Negativkontrolle eine signifikante Abnahme der Luciferaseaktivität auf 63 % ( $0,63 \pm 0,13$ ,  $p < 0,01$ , Abbildung 3.10).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine direkte Regulation der *STK17B* Expression durch die miR-93 über den 3'UTR der *STK17B* stattfindet. Die *STK17B* stellt somit ein direktes Zielgen der miR-93 dar.



**Abbildung 3.10: relative Luciferaseaktivität der Reporterplasmide nach Ko-Transfektion in HEK-Zellen.** Ko-Transfektion von *STK17B(1)* mit premiR-93 (n=12) bzw. *STK17B(2)* mit premiR-93 (n=12) im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle (NC). Darstellung als Mittelwert ± SD, \*p<0.01.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Teile des 3'UTRs an der Regulation der *STK17B* Expression beteiligt sind. Es sollte nun untersucht werden, über welche der Bindestellen dieser Effekt vermittelt wird. Um den Regulationseffekt der einzelnen, mittels TargetScan evaluierten potentiellen Bindungsstellen im 3'UTR der *STK17B* zu untersuchen, wurden die Bindestellen separat sequenziell mutiert.

Hierfür wurden im Bereich der Bindestellen einzelne Basen ausgetauscht, wodurch keine komplementäre Bindung der miR-93 an die mRNA im Bereich der Bindestelle im 3'UTR der *STK17B* mehr möglich ist. Die Sequenz der mutierten Plasmide wurde erneut mittels Sequenzanalyse verifiziert. Eine Gegenüberstellung der Originalbindestellen mit den mutierten Bindestellen ist in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Bindestelle 1 ( <i>STK17B</i> 3'UTR, Basenpaare 103-109)	Bindestelle 1 mutiert in Reporterplasmid mut 1 ( <i>STK17B</i> 3'UTR, BP 103-109)
5' ...GUUUUAU <u>UUGUAAAUGGCACU</u> UUU...	5' ...GUUUUAU <u>UUGUAAAUGGCAAGU</u> UUU...
Bindestelle 2 ( <i>STK17B</i> 3'UTR, Basenpaare 1442-1448)	Bindestelle 2 mutiert in Reporterplasmid mut 2 ( <i>STK17B</i> 3'UTR, BP 1442-1448)
5' ...GAAUAACUAUCAGGUC <u>ACU</u> UUUAU.	5' ... GAAUAACUAUCAGGUC <u>CAAGU</u> UAU
Bindestelle 3 ( <i>STK17B</i> 3'UTR, Basenpaare 2836-2840)	Bindestelle 3 mutiert in Reporterplasmid mut 3 ( <i>STK17B</i> 3'UTR, BP 2836-2840)
5' ...AGUGAAAUUGUAAUG <u>GGCACU</u> UUA..	5' ...AGUGAAAUUGUAAUG <u>GCAAGU</u> UA..
Bindestelle 4 ( <i>STK17B</i> 3'UTR, Basenpaare 3722-3728)	Bindestelle 4 mutiert in Reporterplasmid mut 4 ( <i>STK17B</i> 3'UTR, BP 3722-3728)
5' ...GCUAAAAUUAAAA <u>AGCACU</u> UUU...	5' ...GCUAAAAUUAAAA <u>AGCAAGU</u> UUU...

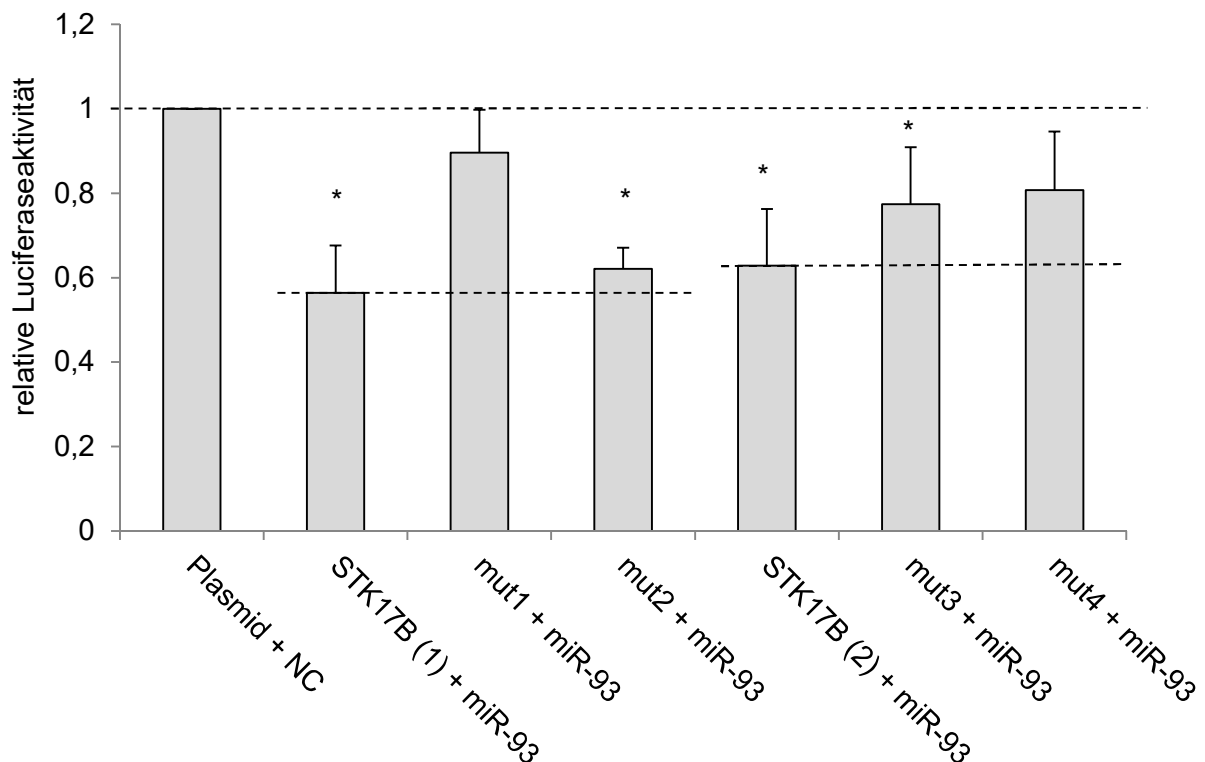
**Tabelle 3.2 Gegenüberstellung der Originalbindestellen mit mutierten Bindestellen.** In der Tabelle sind die Sequenz der komplementären Sequenzen der potentiellen Bindestellen für die miR-93 im 3'UTR der *STK17B* (fett markiert), deren Lage im 3'UTR (Abstand zum CDS stop in Basenpaaren) und die mutierten Basenpaare (unterstrichen) angegeben. Links finden sich die nicht mutierten Sequenzen der Originalbindestellen 1-4, rechts die der mutierten Bindestellen mut1-4.

Nachfolgend wurde premiR-93 bzw. deren Negativkontrolle mit den nicht mutierten Plasmiden *STK17B(1)* bzw. (2), vergleichend zu den entsprechend mutierten Plasmiden mut1, mut2 , mut3 und mut4 in HEK-Zellen ko-transfiziert.

Bei Ko-Transfektion von mut1 mit miR-93 nahm die Luciferaseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle nicht mehr signifikant ab, bei Ko-Transfektion von mut2 mit premiR-93 nahm die Luciferaseaktivität im Vergleich zu Negativkontrolle hingegen weiterhin signifikant auf 62 % ab ( $0,62 \pm 0,05$ ,  $p < 0,01$ , Abbildung 3.11). Bei Ko-Transfektion von mut3 mit miR-93 nahm die Luciferaseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle noch signifikant auf 77 % ab ( $0,77 \pm 0,14$ ,  $p < 0,01$ , Abbildung 3.11). Bei Ko-Transfektion von mut4 mit pre-miR-93 nahm die Luciferaseaktivität nicht mehr signifikant ab (Abbildung 3.11).

Bindestelle 1 und 4 konnten somit als potente Bindestellen für die miR-93 im 3'UTR der *STK17B* nachgewiesen werden. Bindestelle 3 trägt ebenfalls einen wichtigen Anteil am

Regulationseffekt, wenn auch weniger als Bindestelle 1 und 4. Bindestelle 2 trägt kaum Anteil am beobachteten Regulationseffekt.



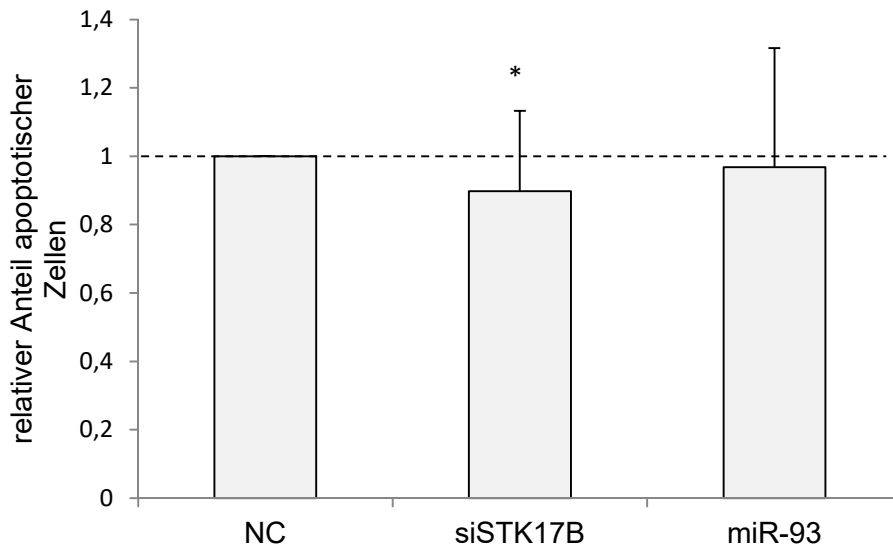
**Abbildung 3.11 relative Luciferaseaktivität der Reporterplasmide nach Ko-Transfektion in HEK-Zellen** Co-Transfektion von premiR-93 mit den Reporterplasmiden *STK17B(1)* (n=12) bzw. mut 1 (n=6) bzw. mut2 (n=6) bzw. *STK17B(2)* (n=12) bzw. mut3 (n=6) bzw. mut4 (n=6) im Vergleich zur jeweiligen miR-Negativkontrolle (NC). Darstellung als Mittelwert  $\pm$  SD, \*p<0.01.

### 3.6 *STK17B* wirkt in humanen CD4<sup>+</sup>T-Zellen proapoptotisch

Da vorbeschrieben ist <sup>[44, 45, 63]</sup>, dass *STK17B* Überepression in Inselzellen des Pankreas oder Fibroblasten (NIH 3T3 cells) proapoptotische Auswirkungen hat, wurde der Einfluss der premiR-93 bzw. siSTK17B auf die Apoptose in CD4<sup>+</sup>T-Zellen untersucht. Primäre CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden nach Transfektion mit premiR-93 oder siSTK17B bzw. der entsprechenden Negativkontrolle, stimuliert und inkubiert. Durchflusszytometrisch wurde dann der Anteil lebender, nekrotischer und apoptotischer Zellen bestimmt.

Der Anteil apoptotischer Zellen zeigte sich nach Transfektion mit siSTK17B im Vergleich zur Kontrolle mit 90 % signifikant geringer ( $0,90 \pm 0,24$ , Abbildung 3.12). Dies spricht dafür, dass wie vorbeschrieben, die *STK17B* auch in CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Apoptose fördert.





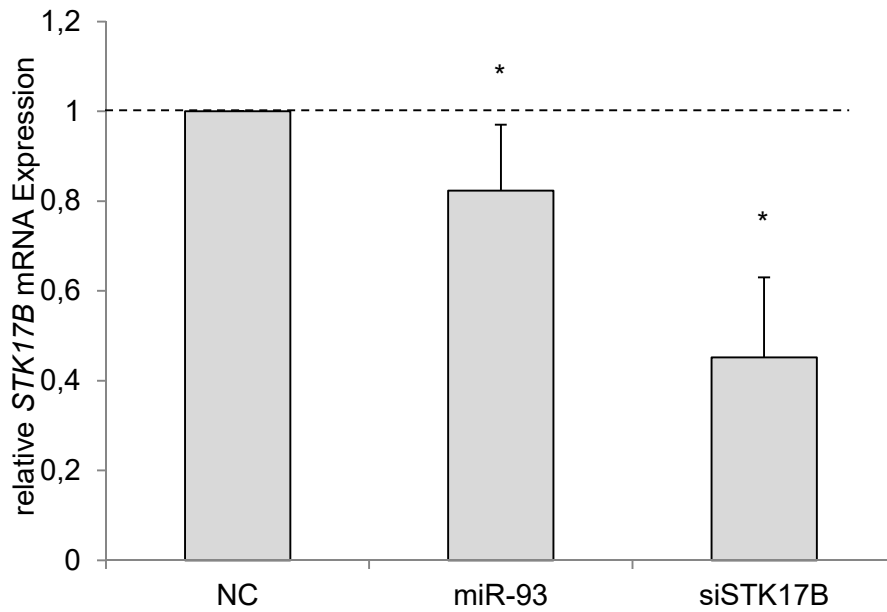
**Abbildung 3.12: relativer Anteil apoptotischer Zellen in transfizierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten.** Transfektion primärer CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit mit siSTK17B (n=10) bzw. miR-93 (n=7) im Vergleich zur entsprechenden Negativkontrolle (NC). Darstellung als Mittelwert ± SD, \*p<0.01

Wurden die primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen hingegen mit miR-93 transfiziert, konnte keine signifikante Änderung des Anteils apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 3.12).

Um zu überprüfen, worin dieser Unterschied begründet liegt, wurde jeweils die Stärke der Regulation nach Transfektion mit miR-93, sowie nach Transfektion mit siSTK17B bestimmt. Es zeigte sich bei Transfektion mit siSTK17B eine Reduktion der STK17B mRNA Expression um 55 % (siSTK17B 0,45 ± 0,18, Abbildung 3.13). Bei Transfektion mit miR-93 zeigte sich hingegen, wie oben bereits erläutert, lediglich eine Reduktion der STK17B mRNA Expression um 18 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 3.4, Abbildung 3.13).

Dies kann erklären, weshalb der Effekt auf die Apoptose nur bei Transfektion mit siSTK17B signifikant ersichtlich wird, da der regulatorische Effekt einer in-vitro-Transfektion von miR-93 nicht ausreicht, um diesen antiapoptotischen Effekt zu zeigen.

Dies genauer zu untersuchen, wird Gegenstand weiterer Studien sein.



**Abbildung 3.13 Regulation der STK17B-Expression nach Transfektion mit miR-93 im Vergleich zu *siSTK17B* versus Negativkontrolle (NC).**

Aus EDTA-Vollblut gesunder Probanden wurden primäre CD4<sup>+</sup>T-Zellen durch Negativelektion gewonnen. Hieraus wurde RNA extrahiert und nach reverser Transkription mittels qPCR die *STK17B* mRNA-Expression bestimmt. Dargestellt ist die relative *STK17B* mRNA-Expression nach Transfektion mit miR-93 (n=10) vs. *siSTK17B* (n=8) bzw. der Negativkontrolle (NC) als Mittelwert ± SD, \*p<0,01.

## 4 Diskussion

Die Sepsis ist ein häufiges und bedeutendes Krankheitsbild, welches in seinen molekularen Prozessen noch immer nicht vollständig verstanden ist. Trotz der Möglichkeiten der modernen Intensivmedizin ist die Sepsis noch immer mit einer hohen Letalität verbunden. Bisher sind die therapeutischen Optionen auf supportive Maßnahmen sowie eine antimikrobielle Therapie beschränkt.

Dabei sind micro-RNAs (miRNAs) zunehmend ins Blickfeld der Forschung gerückt. MiRNAs sind kurze RNA-Moleküle, die endogen gebildet werden und auf posttranskriptioneller Ebene verschiedenste Signalwege regulieren<sup>[18]</sup>. Sie modulieren unter anderem die Expression von pro- und antiinflammatorischen Genen und spielen somit bei vielen immunologischen Prozessen eine wesentliche Rolle<sup>[54]</sup>.

Auch bei Sepsis stellen immunologische Prozesse einen zentralen Pathomechanismus dar, sodass sich die aktuelle Forschung aus der Aufklärung der Regulationsmechanismen durch miRNAs bei Sepsis neue diagnostische und therapeutische Ansatzpunkte erhofft.

Pathophysiologisch dominiert bei Sepsis eine immunologische Dysregulation mit einer Lymphozytendysfunktion, einer initial eher hyperinflammatorischen Phase sowie im Verlauf zunehmenden immunsuppressiven Mechanismen<sup>[16, 24]</sup>.

Eine miRNA-Expressionsanalyse aus PanT-Zellen von humanen Sepsispatienten im Vergleich zu gesunden Probanden zeigte die differenzierte Expression einer Anzahl von miRNAs. Die miR-93 zeigte sich dabei bei Patienten mit Sepsis im Vergleich zu gesunden Probanden überexprimiert. Die miR-93 Überexpression in pan-T-Zellen von Erkrankten gibt Anhalt für eine Rolle der miR-93 bei der Pathogenese der Sepsis. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde *in vitro* untersucht, welchen Einfluss die miR-93 auf die T-Zellfunktion hat. Insbesondere war dabei von Interesse welche Zielgene hierbei durch die miR-93 reguliert werden.

Da eine miR viele Zielgene reguliert und ein Zielgen wiederum von vielen miRs reguliert wird, wurde zunächst eine *in silico* Analyse durchgeführt, um die experimentellen Untersuchungen auf einige wenige relevante Zielgene einzugrenzen. Mittels TargetScan Release 6.2 wurden mögliche Zielgene der miR-93 aufgrund Wahrscheinlichkeiten von Interaktionen zwischen der miR-93 und mRNA vorhergesagt.

Als potentielles Zielgen zeigte sich hierbei die Serin-Threonin-Kinase 17B (*STK17B*), auch *DRAK2* genannt<sup>[53]</sup>, welche vier potentielle Bindestellen aufweist. Sie wurde aufgrund eines guten Scores in der *in silico* Analyse ausgewählt. Die *STK17B* gehört zur Familie der death-associated protein (DAP)-like serine/threonine kinases<sup>[15, 64]</sup> und wird in B- und T-Zellen stark exprimiert<sup>[67, 68]</sup>. Mitglieder dieser Genfamilie sind an apoptotischen Prozessen beteiligt<sup>[63]</sup>.

Auch für die STK17B konnte in früheren Studien in murinen Pankreas und T- Zellen eine proapoptotische Wirkung nachgewiesen werden <sup>[44-46, 63]</sup>.

Es ist außerdem bekannt, dass bei STK17B Knockdown Mäusen der Schwellenwert für die T-Zellrezeptoraktivierung bereits bei geringeren Reizen ermöglicht, sodass von einer negativen Regulation der T-Zellrezeptoraktivierung durch die STK17B ausgegangen wird <sup>[48]</sup>. In transgenen Mäusen mit ektopter STK17B-Überexpression liegen weniger reife positive CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten vor, jedoch eine erhöhte Anfälligkeit für sekundäre Hypersensitivitätsreaktionen vom T-Zelltyp und spontane Autoimmunreaktionen im Vergleich zum Wildtyp <sup>[20]</sup>. Die STK17B Abwesenheit begünstigt die Entwicklung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen <sup>[48]</sup>. Eine immunologische Relevanz der STK17B liegt daher nahe.

Es wurde nun die Hypothese untersucht, ob die gefundene miR-93-Expressionssteigerung bei Sepsis über eine Herabregulation der STK17B zu einer verminderten Apoptose von T-Zellen in der Frühphase der Sepsis beiträgt.

Um die *in silico* vermutete Interaktion zwischen der miR-93 und der STK17B zu verifizieren, wurde die Auswirkung einer miR-93 Überexpression in T-Lymphozyten auf die Expression von STK17B untersucht. Hierzu wurden CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten gesunder Probanden mit premiR-93 transfiziert. Es zeigten sich dabei eine signifikante Abnahme der STK17B-mRNA Expression, sowie eine verminderte STK17B-Proteinexpression. Dies bedeutet, dass die STK17B-Expression direkt oder indirekt durch die miR-93 reguliert wird.

Um einen direkten Wirkmechanismus nachzuweisen, wurde eine experimentelle Überprüfung mittels Luciferase-Reporter-Assay durchgeführt. Hierzu wurde die STK17B-3'UTR, welche die angenommenen Bindestellen für die miR-93 trägt, in die Multiple Cloning Site eines Luciferase-Reportergen-Vektors kloniert. Der Reportergen-Vektor codiert für die beiden Luciferasen Renilla und Firefly. Die Firefly-Luciferase wird konstant exprimiert und dient zur Normalisierung der Transfektionseffizienz. Die Renilla Luciferase ist mit dem einklonierten 3'UTR fusioniert. Die Aktivität der Renilla Luciferase ist bei direkter Bindung der miR-93 an den 3'UTR durch die miRNA regulierbar.

Die Transfektion von miR-93 führte zu einer signifikanten Abnahme der relativen Luciferase-Aktivität. Damit konnte in CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten gesunder Probanden erstmalig die Regulation der STK17B durch direkte Bindung der miR-93 an die STK17B-mRNA an den 3'UTR der STK17B nachgewiesen werden. Die STK17B konnte damit als direktes Zielgen der miR-93 nachgewiesen werden.

Als nächstes wurden die vier angenommenen Bindestellen einzeln auf ihre funktionelle Relevanz hin überprüft. Dazu erfolgte die separate, sequentielle Mutation jeder einzelnen Bindestelle für miR-93 im STK17B-3'UTR. Hierbei konnte gezeigt werden, dass zwei

Bindestellen stark, eine schwach und eine nicht am beobachteten Regulationseffekt beteiligt sind.

Die pro-apoptotische Wirkung der STK17B wurde bisher nicht in humanen T-Zellen überprüft. Es ist daher bisher nicht klar ob auch in humanen T-Zellen die Apoptose durch die STK17B gefördert wird.

Im Folgenden wurde nun untersucht, ob die STK17B auch in humanen primären T-Zellen eine pro-apoptotische Wirkung hat und ob dies durch Transfektion von miR-93 beeinflusst wird. Um die pro-apoptotische Wirkung der STK17B zu überprüfen, wurden primäre T-Zellen mit siSTK17B transfiziert. Der Anteil apoptotischer Zellen zeigte sich dabei nach siSTK17B Transfektion, im Vergleich zu mit der Negativkontrolle transfizierten Zellen, vermindert, sodass auch in humanen primären T-Zellen eine pro-apoptotische Wirkung der STK17B nachgewiesen werden konnte. Zur Evaluation eines regulatorischen Effekts auf die Apoptose durch die miR-93 wurden nun primäre T-Zellen mit miR-93 transfiziert. Dabei konnte kein signifikanter regulatorischer Effekt auf die Apoptose durch die miR-93 nachgewiesen werden. Jedoch zeichnete sich ein Trend ab: Bei Transfektion mit miR-93 zeigte sich, im Vergleich zur Transfektion mit der entsprechenden Negativkontrolle, der Anteil apoptotischer Zellen leicht reduziert, auch wenn rechnerisch kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte.

Bei jedoch lediglich 30-50 % Transfektionseffizienz bei Transfektion von miR-93 in T-Zellen ist zu vermuten, dass - läge die Transfektionseffizienz bei 100% - der Effekt auf den Anteil apoptotischer Zellen deutlicher sichtbar wäre.

Die unterschiedlichen Effekte auf die Apoptose sind auch durch die stärkere Repression der STK17B Expression durch siRNA per se zu erklären. Begründet liegt dies an der vollständigen Komplementarität der siRNA mit mRNA und konsekutiver mRNA Degradierung. Bei mRNA hingegen findet aufgrund der lediglich partiellen Komplementarität nur eine Unterdrückung der mRNA Expression statt <sup>[39]</sup>.

Bei Transfektion mit siSTK17B konnte daher auch eine deutlich stärkere Regulation der STK17B mRNA Expression beobachtet werden, als nach Transfektion mit miR-93.

Der hier postulierte anti-apoptotische Effekt der miR-93 bei Sepsis steht in scheinbarem Widerspruch zu aktuellen Studien, welche eine gesteigerte Apoptose von T-Zellen als wesentlichen Pathomechanismus bei der septischen Immunsuppression zeigten <sup>[11, 16, 24]</sup>. Hierbei muss jedoch zwischen Früh- und Spätphase der Sepsis unterschieden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Immunzellen von Patienten in der Frühphase der Sepsis analysiert; die septische Immunsuppression jedoch ist für die Spätphase der Sepsis beschrieben. Auf der Basis der hier vorgestellten Daten könnte ein Modell eines initial gesteigerten Überlebens der Zellen in der hyperinflammatorischen Frühphase der Sepsis

und eine dann gesteigerte Apoptose in der Spätphase des Krankheitsverlaufs entwickelt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Sepsis stellt eine lebensbedrohliche Erkrankung dar und führt noch immer in einem hohen Prozentsatz zum Tode. Das Krankheitsbild beruht auf einer komplexen systemischen Immunreaktion, in der Phasen der Hyperinflammation und der Immunparalyse auftreten können. Während bislang die angeborene Immunität im Fokus der Sepsisforschung stand, legen neuere Studien nahe, dass eine Fehlregulierung der T-Zellantwort ebenfalls maßgeblich zum septischen Krankheitsgeschehen beiträgt. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bislang nur unzureichend verstanden.

Mithilfe von Arrayuntersuchungen konnte in Vorversuchen in T-Zellen von Sepsispatienten im Vergleich zu Gesunden miR-93 als differentiell exprimiert gefunden werden. In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde nun die Rolle der miR-93 im Krankheitsbild der Sepsis näher untersucht. Insbesondere die Identifizierung, Validierung und funktionelle Charakterisierung möglicher Zielgene stand dabei im Vordergrund.

Es wurde die Serin-Threonin-Kinase STK17B als Zielgen der miR-93 in silico identifiziert und nachfolgend mithilfe von Transfektions- und Reporterexperimenten validiert. Untersuchungen zur biologischen Funktion dieser Regulation zeigten eine Beteiligung an apoptotischen Prozessen der T-Zellen. Mithilfe von siRNA-Experimenten konnte eine signifikante pro-apoptotische Wirkung der STK17B in T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Aufgrund sehr geringer Transfektionseffizienz primärer humaner T-Lymphozyten mit miR-93 konnte der vermutete, durch Targeting der STK17B hervorgerufene anti-apoptotische Effekt der miR-93 jedoch nicht vollständig nachgewiesen werden. Die Etablierung alternativer Transfektionskonzepte wird Aufgabe nachfolgender Studien sein.

Die vorliegende Promotionsarbeit kann dazu beitragen, den Einfluß von miRNAs in der Steuerung der T-Zellantwort bei Sepsis zu verstehen und miRNAs zu identifizieren, die sich als molekulare Marker im Verlauf des septischen Krankheitsgeschehens eignen.

## Summary

Sepsis is a life-threatening disorder and one of the leading causes of death in intensive care medicine worldwide. The underlying cause is a complex systemic condition of dysregulated immune responses with both phases of hyperinflammation and immunosuppression. While sepsis research during the last decades mainly focused the innate immunity, there is currently increasing evidence for a crucial role of the T lymphocytes in the pathogenesis of the disease. However, the molecular mechanisms driving phenotypic and functional alterations of T cells in sepsis largely remain unknown.

Preliminary experiments using array analyses of T cells of sepsis patients revealed that miR-93 is differentially expressed in sepsis as compared to healthy controls. In this thesis, the role of miR-93 in sepsis was investigated in more detail. In particular, the identification, validation and functional characterization of possible target genes was the main focus.

The serine threonine kinase STK17B was identified as a target gene of miR-93 *in silico* and was subsequently validated by transfection and reporter gene experiments. Experimental characterization of the biological function of this regulation showed involvement in apoptotic processes of T cells. siRNA experiments showed a significant pro-apoptotic effect of STK17B in T lymphocytes.

However, due to very low transfection efficiency of primary human T lymphocytes with miR-93, the suspected anti-apoptotic effect of miR-93 caused by targeting of STK17B could not be fully demonstrated. The establishment of alternative transfection concepts will be the task of subsequent studies.

The present doctoral thesis may contribute to a better understanding of miRNAs in the control of the T cell response in sepsis and may help to identify miRNAs which are suitable molecular markers in the course of septic diseases.



## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Andersen, M. H. (2013). "Keeping each other in check: a reciprocal relationship between cytokines and miRNA." *Cell Cycle* 12(14): 2171.
- [2] Angus, D. C., et al. (2001). "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care." *Crit Care Med* 29(7): 1303-1310.
- [3] Angus, D. C. and T. van der Poll (2013). "Severe sepsis and septic shock." *N Engl J Med* 369(9): 840-851.
- [4] Aziz, M., et al. (2013). "Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis." *J Leukoc Biol* 93(3): 329-342.
- [5] Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* 116(2): 281-297.
- [6] Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* 136(2): 215-233.
- [7] Bernstein, E., et al. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* 409(6818): 363-366.
- [8] Bone, R. C. (1996). "Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS." *Crit Care Med* 24(7): 1125-1128.
- [9] Bone, R. C., et al. (1992). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." *Chest* 101(6): 1644-1655.
- [10] Boomer, J. S., et al. (2014). "The changing immune system in sepsis: is individualized immuno-modulatory therapy the answer?" *Virulence* 5(1): 45-56.
- [11] Boomer, J. S., et al. (2012). "A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis." *Crit Care* 16(3): R112.

- [12] Caserta, S., et al. (2016). "Circulating Plasma microRNAs can differentiate Human Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)." *Sci Rep* 6: 28006.
- [13] Chendrimada, T. P., et al. (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." *Nature* 436(7051): 740-744.
- [14] Christine Schütt, B. B. (2011). "Grundwissen Immunologie." Spektrum 3. Auflage.
- [15] Comittee, H. G. N. (2015). from <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/1021>.
- [16] Delano, M. J. and P. A. Ward (2016). "Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality?" *J Clin Invest* 126(1): 23-31.
- [17] Evans, T. J. (1996). "The role of macrophages in septic shock." *Immunobiology* 195(4-5): 655-659.
- [18] Filipowicz, W., et al. (2005). "Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs." *Curr Opin Struct Biol* 15(3): 331-341.
- [19] Garcia, D. M., et al. (2011). "Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs." *Nat Struct Mol Biol* 18(10): 1139-1146.
- [20] Gatzka, M., et al. (2009). "Altered thymic selection and increased autoimmunity caused by ectopic expression of DRAK2 during T cell development." *J Immunol* 183(1): 285-297.
- [21] Griffiths-Jones, S., et al. (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." *Nucleic Acids Res* 34(Database issue): D140-144.
- [22] He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." *Nat Rev Genet* 5(7): 522-531.
- [23] Herold, G. (2011). *Innere Medizin*. Köln, Gerd Herold.

- [24] Hotchkiss, R. S., et al. (2013). "Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy." *Nat Rev Immunol* 13(12): 862-874.
- [25] Hotchkiss, R. S., et al. (1997). "Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice." *Crit Care Med* 25(8): 1298-1307.
- [26] Hotchkiss, R. S., et al. (1999). "Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction." *Crit Care Med* 27(7): 1230-1251.
- [27] Hotchkiss, R. S., et al. (1999). "Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25): 14541-14546.
- [28] ilneBrunkhorst, F. M. (2006). "[Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]." *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 41(1): 43-44.
- [29] Lindsay, M. A. (2008). "microRNAs and the immune response." *Trends Immunol* 29(7): 343-351.
- [30] K. Reinhart, F. M. B., H.-G. Bone, J. Bardutzky, C.-E. Dempfle, Mannheim, H. Forst, P. Gastmeier, H. Gerlach, M. Gründling, S. John, W. Kern, G. Kreymann, W. Krüger, P. Kujath, G. Marggraf, J. Martin, K. Mayer, A. Meier-Hellmann, M. Oppert, C. Putensen M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, H. Seifert, C. Spies, F. Stüber, N. Weiler, A. Weimann, K. Werdan und T. Welte (2010). "Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis 1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)."
- [31] Konstantine N. Tzimas, M., and Peter J. Papadakos, MD (2013). "An Updated Review of Sepsis for the Anesthesiologist." *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*.
- [32] Kopp, K. L., et al. (2013). "STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma." *Cell Cycle* 12(12): 1939-1947.
- [33] Lagos-Quintana, M., et al. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." *Science* 294(5543): 853-858.

- [34] Lan, C., et al. (2016). "[Value of serum miR-155-5p and miR-133a-3p expression for the diagnosis and prognosis evaluation of sepsis]." *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 28(8): 694-698.
- [35] Le Tulzo, Y., et al. (2002). "Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome." *Shock* 18(6): 487-494.
- [36] Lee, R. C., et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* 75(5): 843-854.
- [37] Lee, Y., et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." *Nature* 425(6956): 415-419.
- [38] Leentjens, J., et al. (2013). "Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change?" *Am J Respir Crit Care Med* 187(12): 1287-1293.
- [39] Lewis, B. P., et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." *Cell* 120(1): 15-20.
- [40] Liu, J., et al. (2015). "Elevated miR-155 expression induces immunosuppression via CD39(+) regulatory T-cells in sepsis patient." *Int J Infect Dis* 40: 135-141.
- [41] Liu, S., et al. (2016). "microRNA-23a-5p acts as a potential biomarker for sepsis-induced acute respiratory distress syndrome in early stage." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 62(2): 31-37.
- [42] Lund, E., et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." *Science* 303(5654): 95-98.
- [43] Ma, H., et al. (2016). "MicroRNA-125b prevents cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis by targeting TRAF6 mediated NFkappaB activation and p53 mediated apoptotic signaling." *J Infect Dis*.
- [44] Mao, J., et al. (2009). "Drak2 is upstream of p70S6 kinase: its implication in cytokine-induced islet apoptosis, diabetes, and islet transplantation." *J Immunol* 182(8): 4762-4770.

- [45] Mao, J., et al. (2008). "Drak2 overexpression results in increased beta-cell apoptosis after free fatty acid stimulation." *J Cell Biochem* 105(4): 1073-1080.
- [46] Mao, J., et al. (2006). "Transgenic drak2 overexpression in mice leads to increased T cell apoptosis and compromised memory T cell development." *J Biol Chem* 281(18): 12587-12595.
- [47] Marques-Rocha, J. L., et al. (2015). "Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases." *FASEB J*.
- [48] McGargill, M. A., et al. (2004). "A deficiency in Drak2 results in a T cell hypersensitivity and an unexpected resistance to autoimmunity." *Immunity* 21(6): 781-791.
- [49] Modlin, R. L., et al. (1999). "The toll of innate immunity on microbial pathogens." *N Engl J Med* 340(23): 1834-1835.
- [50] Moerer, O. and H. Burchardi (2006). "[The cost of sepsis]." *Anaesthesist* 55 Suppl 1: 36-42.
- [51] Montanini, L., et al. (2012). "MicroRNA cloning and sequencing in osteosarcoma cell lines: differential role of miR-93." *Cell Oncol (Dordr)* 35(1): 29-41.
- [52] Mühlhardt, D. C. (2009). "Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics." Spektrum 6.Auflage: 111.
- [53] National Center for Biotechnology Information, U. S. N. L. o. M. (2015). "STK17B serine/threonine kinase 17b [ Homo sapiens (human) ]." from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9262>.
- [54] O'Connell, R. M., et al. (2012). "microRNA regulation of inflammatory responses." *Annu Rev Immunol* 30: 295-312.
- [55] Pauley, K. M., et al. (2009). "MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases." *J Autoimmun* 32(3-4): 189-194.
- [56] Pfaffl, M. (2004). Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*. 01: 92-95.

- [57] Rana, T. M. (2007). "Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1): 23-36.
- [58] Rimmele, T., et al. (2016). "IMMUNE CELL PHENOTYPE AND FUNCTION IN SEPSIS." *Shock* 45(3): 282-291.
- [59] Rittirsch, D., et al. (2008). "Harmful molecular mechanisms in sepsis." *Nat Rev Immunol* 8(10): 776-787.
- [60] Robb, G. B. and T. M. Rana (2007). "RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading." *Mol Cell* 26(4): 523-537.
- [61] Russell, J. A. (2006). "Management of sepsis." *N Engl J Med* 355(16): 1699-1713.
- [62] S. Hagel, P. D. F. B. (2011). "Sepsis." *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 48(1): 57-73.
- [63] Sanjo, H., et al. (1998). "DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis." *J Biol Chem* 273(44): 29066-29071.
- [64] Shiloh, R., et al. (2014). "The DAPK family: a structure-function analysis." *Apoptosis* 19(2): 286-297.
- [65] Singer, M., et al. (2016). "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)." *JAMA* 315(8): 801-810.
- [66] Soifer, H. S., et al. (2007). "MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications." *Mol Ther* 15(12): 2070-2079.
- [67] Su, A., et al. (2015). "Gene expression/activity chart for STK17B." from <http://biogps.org/#goto=genereport&id=9262>.
- [68] Su, A. I., et al. (2002). "Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4465-4470.

- [69] Unsinger, J., et al. (2009). "Differential lymphopenia-induced homeostatic proliferation for CD4+ and CD8+ T cells following septic injury." *J Leukoc Biol* 85(3): 382-390.
- [70] Wang, H., et al. (2016). "Inhibition of miR-155 Protects Against LPS-induced Cardiac Dysfunction and Apoptosis in Mice." *Mol Ther Nucleic Acids* 5(10): e374.
- [71] Wang, Z. (2010). "MicroRNA: A matter of life or death." *World J Biol Chem* 1(4): 41-54.
- [72] Ward, N. S., et al. (2008). "The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients." *Clin Chest Med* 29(4): 617-625, viii.
- [73] Yekta, S., et al. (2004). "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA." *Science* 304(5670): 594-596.
- [74] Yi, R., et al. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes Dev* 17(24): 3011-3016.
- [75] Zampetaki, A., et al. (2012). "Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks." *Cardiovasc Res* 93(4): 555-562.
- [76] Zheng, D., et al. (2016). "Inhibition of MicroRNA 195 Prevents Apoptosis and Multiple-Organ Injury in Mouse Models of Sepsis." *J Infect Dis* 213(10): 1661-1670.

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Wirtsantwort auf Pathogene bei schwerer Sepsis <sup>[3]</sup> .....	7
<b>Abbildung 1.2:</b> Schematische Darstellung der miRNA Entstehung (modifiziert nach <sup>[5]</sup> ).....	10
<b>Abbildung 3.1:</b> Gesteigerte miR-93-Expression in PanT-Zellen bei Sepsispatienten im Vergleich zu gesunden Probanden.....	46
<b>Abbildung 3.2:</b> Evaluation potentieller Zielgene der miR-93 durch TargetScan. Dargestellt sind durch TargetScan vorgeschlagene potentielle Zielgene der miR-93, sortiert nach dem „Total context+ score“ in absteigender Reihenfolge. Rot markiert das Ergebnis für die Serin Threonin Kinase 17B (STK17B).....	47
<b>Abbildung 3.3</b> Schematische Darstellung der Bindestellen der miR-93 im 3-UTR der <i>STK17B</i> mRNA .....	48
<b>Abbildung 3.4</b> Regulation der STK17B-Expression nach Transfektion mit miR-93 versus Negativkontrolle (NC).....	49
<b>Abbildung 3.5:</b> STK17B-Proteinexpression in primären T-Lymphozyten nach Transfektion mit miR-93 .....	50
<b>Abbildung 3.6:</b> Graphische Charakterisierung der Reporterplasmide. Genkarte des psiCHECK™-2 Vektors: Rot markiert ist die Multiple Cloning Site mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme <i>PmeI</i> und <i>XhoI</i> . Hier wird je Teil 1 bzw. 2 des 3'UTRs der STK17B in den Vektor ligiert. Grün ist die Firefly Luciferase (hluc+), blau die Renilla Luciferase (hRluc) und orange die Ampicillinresistenz (Amp <sup>r</sup> ) gekennzeichnet.....	51
<b>Abbildung 3.7</b> Schematische Darstellung der <i>STK17B</i> -mRNA mit den Bindestellen 1-4. Rot markiert die evolutionär konservierten (conserved), orange eine weniger konservierte (poorly conserved) Bindestelle für die miR-93. Der Pfeil markiert im 3'UTR die Trennungsstelle bei der Klonierung in Teil 1 ( <i>STK17B(1)</i> ) und Teil 2 ( <i>STK17B(2)</i> ) des 3'UTRs. Die kodierende Sequenz (CDS) ist dunkelblau unterlegt. Die vertikal geschriebenen Zahlen geben den Abstand vom CDS Stop Codon in Basenpaaren an. ....	52
<b>Abbildung 3.8</b> Schematische Darstellung des 5'-seitigen Anteils des <i>STK17B</i> 3'UTRs mit Bindestelle 1 und 2 .....	52
<b>Abbildung 3.9</b> Schematische Darstellung des 3'-seitigen Anteils des <i>STK17B</i> 3'UTRs mit den Bindestellen 3 und 4 .....	53
<b>Abbildung 3.10:</b> relative Luciferaseaktivität der Reporterplasmide nach Ko-Transfektion in HEK-Zellen. Ko-Transfektion von <i>STK17B(1)</i> mit premiR-93 (n=12)	



bzw. <i>STK17B</i> (2) mit premiR-93 (n=12) im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle (NC). Darstellung als Mittelwert $\pm$ SD, *p<0.01. ....	54
<b>Abbildung 3.11</b> relative Luciferaseaktivität der Reporterplasmide nach Ko-Transfektion in HEK-Zellen Co-Transfektion von premiR-93 mit den Reporterplasmiden <i>STK17B</i> (1) (n=12) bzw. mut 1 (n=6) bzw. mut2 (n=6) bzw. <i>STK17B</i> (2) (n=12) bzw. mut3 (n=6) bzw. mut4 (n=6) im Vergleich zur jeweiligen miR-Negativkontrolle (NC). Darstellung als Mittelwert $\pm$ SD, *p<0.01.....	56
<b>Abbildung 3.12:</b> relativer Anteil apoptotischer Zellen in transfizierten CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten. Transfektion primärer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen mit mit siSTK17B (n=10) bzw. miR-93 (n=7) im Vergleich zur entsprechenden Negativkontrolle (NC). Darstellung als Mittelwert $\pm$ SD, *p<0.01.....	57
<b>Abbildung 3.13</b> Regulation der STK17B-Expression nach Transfektion mit miR-93 im Vergleich zu si <i>STK17B</i> versus Negativkontrolle (NC).....	58

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1:</b> Verwendeter Primer .....	23
<b>Tabelle 2.2:</b> Einfacher Reaktionsansatz zur relativen Quantifizierung von mRNA.....	30
<b>Tabelle 2.3:</b> Reaktionsbedingungen zur relativen Quantifizierung von mRNA.....	31
<b>Tabelle 2.4:</b> TaqMan®-Assay: Einfacher Reaktionsansatz zur Transkription in cDNA .....	31
<b>Tabelle 2.5:</b> TaqMan®-Assay: Reaktionsbedingungen zur Trankription in cDNA.....	32
<b>Tabelle 2.6:</b> TaqMan®-Assay: Einfacher Reaktionsansatz zur Quantifizierung reifer miRNA.....	32
<b>Tabelle 2.7:</b> TaqMan®-Assay: Reaktionsbedingungen zur Quantifizierung reifer miRNA.....	32
<b>Tabelle 2.8:</b> Einfacher Reaktionsansatz zur Amplifikation des 3'UTR der STK17B .....	33
<b>Tabelle 2.9:</b> Reaktionsbedingungen zur Amplifikation des 3'UTR der STK17B .....	33
<b>Tabelle 2.10:</b> Einfacher Reaktionsansatz zur Selektion positiver Klone .....	35
<b>Tabelle 2.11:</b> Reaktionsbedingungen zur Selektion positiver Klone .....	35
<b>Tabelle 2.12:</b> Einfacher Reaktionsansatz zur Mutagenese der miR-93 Bindestellen im STK17B 3'UTR.....	39
<b>Tabelle 2.13:</b> Reaktionsbedingungen zur Mutagenese der miR-93 Bindestellen im STK17B 3'UTR.....	39
<b>Tabelle 3.1:</b> Bindestellen der hsa-miR 93 im 3'UTR der <i>STK17B</i> mRNA .....	48
<b>Tabelle 3.2</b> Gegenüberstellung der Originalbindestellen mit mutierten Bindestellen. In der Tabelle sind die Sequenz der komplementären Sequenzen der potentiellen Bindestellen für die miR-93 im 3'UTR der <i>STK17B</i> (fett markiert), deren Lage im 3'UTR (Abstand zum CDS stop in Basenpaaren) und die mutierten Basenpaare (unterstrichen) angegeben. Links finden sich die nicht mutierten Sequenzen der Originalbindestellen 1-4, rechts die der mutierten Bindestellen mut1-4.....	55

## **9 Danksagung**

Am Ende möchte ich mich als erstes ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Simone Kreth bedanken, die sich stets um das bestmögliche Gelingen der Arbeit bemüht hat und mir grundlegende Aspekte wissenschaftlichen Arbeitens nahegebracht hat. Zudem bedanke ich mich ganz besonders für die qualifizierte fachliche Betreuung im Verlauf dieser Arbeit.

Ein ganz herzlicher Dank geht an alle Kollegen im Labor, die mich während dieser Zeit mit Rat und Tat unterstützt haben. Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Jessica Rink, Gabriele Gröger, Samra Alijagic, Marco Gäbler und Max Hübner bedanken, ohne die diese Arbeit vermutlich nie zu Stande gekommen wäre.

Zum Schluss gilt mein tiefer Dank meiner Familie, meinen Eltern und meinem Partner, die mich stets durch alle Höhen und Tiefen begleiten.