

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

Posttranskriptionelle Regulation des Mucins MUC5AC durch microRNAs

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der
Medizin an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu
München
Vorgelegt von
Julián Antón
aus München
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Simone Kreth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Alexander Dietrich

Priv. Doz. Dr. Katja Anslinger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2020

Eidesstaatliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „**Posttranskriptionelle Regulation des Mucins MUC5AC durch microRNAs**“ selbstständig 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, den 04.12.2020

Julián Antón

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	ARDS – Definition, Inzidenz, klinische Bedeutung.....	1
1.2	ARDS - Pathogenese	2
1.3	Mucine – Produktion und Regulation.....	3
1.4	MicroRNAs	4
1.5	Ziele der Arbeit	5
2	Materialien.....	7
2.1.1	Geräte.....	7
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	8
2.1.3	Assays und Kits	9
2.1.4	Reagenzien	10
2.1.5	Selbsthergestellte Gele und Medien.....	12
2.1.6	Primer	13
2.1.7	Software	14
3	Angewandte Methoden	15
3.1	Zellkultur.....	15
3.2	Transfektion mittels Elektroporation	15
3.3	RNA-Isolation	16
3.4	cDNA-Synthese	16
3.5	Bestimmung der mRNA-Expression mittels Realtime-PCR	17
3.6	3'RLM-RACE	18
3.7	Klonierung StrataClone Kit.....	20
3.7.1	Polymerase Kettenreaktion.....	20
3.7.2	Ligation in Topovektor	21
3.7.3	Transformation.....	21

3.8	Plasmidpräparation mit Mini- und Midiprep	21
3.9	Restriktionsverdau und Integration in den Reportervektor psiCHECK2	22
3.10	Gelelektrophorese und Auswertung	22
3.11	Wizard PCR Clean-up	23
3.12	Luciferase-Assay	23
3.13	TaqMan	24
3.14	Statistische und bioinformatische Analysen	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Untersuchung der relativen Genexpression von MUC5AC nach Dicer-Knockdown ..	26
4.2	MUC5AC-Genstruktur	27
4.2.1	Ausgangssituation	27
4.2.2	Überprüfung einer Überlappung von MUC5AC und MUC5AC-like	27
4.2.3	Ermittlung der Länge der 3'-UTR	30
4.2.4	Sequenzierung der 3'-UTR	30
4.3	Bioinformatische Identifikation potentiell regulierender miRNAs	31
4.4	Untersuchung der relativen Genexpression nach Transfektion mit miRNA	32
4.5	Luciferase-Assays	33
4.6	Untersuchung der Expression der untersuchten miRNAs in A549-Zellen	34
5	Diskussion der Ergebnisse	35
6	Zusammenfassung	39
7	Summary	40
8	Literaturverzeichnis	41
9	Abkürzungsverzeichnis	46
10	Abbildungsverzeichnis	47
11	Danksagung	48

1 Einleitung

1.1 ARDS – Definition, Inzidenz, klinische Bedeutung

Das akute Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome, in der Folge mit seiner in Klinik und Literatur gebräuchlichen Abkürzung ARDS bezeichnet) ist ein lebensbedrohliches Krankheitsbild und als schwerwiegende Komplikation unterschiedlicher Grunderkrankungen gefürchtet.

Seit der Erstbeschreibung durch David Ashbough im Jahre 1967 [1], war die Definition des ARDS wiederholtem Wandel unterworfen. Die seit 2012 gültige, von der internationalen ARDS-Taskforce erarbeitete, sog. Berlin-Definition fordert für die Diagnose eines ARDS den Nachweis bilateraler pulmonaler Infiltrate, welche nicht vollständig durch Pleuraergüsse, Atelektasen oder Rundherde zu erklären sind, innerhalb einer Woche nach Auftreten von Risikofaktoren oder respiratorischer Symptome. Auch müssen Herzinsuffizienz und Hypervolämie als primäre ätiopathogenetische Faktoren ausgeschlossen sein. Als Risikofaktoren zur Entwicklung eines ARDS wurden Pneumonie, Aspiration, Inhalationstrauma, Lungenkontusion, pulmonale Vaskulitis, Beinahe-Ertrinken, nicht-pulmonale Sepsis, Trauma, Pankreatitis, Verbrennungen, nicht-kardiogener Schock, Intoxikationen und Massentransfusion (transfusion associated acute lung injury, TRALI) determiniert. [2-5]

Wie wiederholte epidemiologische Studien zeigen konnten, ist die Pneumonie, gefolgt von der Sepsis nicht-pulmonaler Genese, der häufigste Risikofaktor für die Entwicklung eines ARDS. [3, 5, 6]

Entsprechend der zuvor allgemein anerkannten Definition (AECC-Definition)[7] bedient sich auch die Berlin-Definition des Horowitz-Quotienten ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) als Maß der Hypoxie zur Einteilung des Schweregrades des ARDS. Hiermit werden aktuell drei Schweregrade unterschieden. Ab einem Horowitz-Index kleiner 300mmHg bis 200mmHg wird von einem milden, von 200 bis 100mmHg von einem moderaten und kleiner 100mmHg von einem schweren ARDS gesprochen. Voraussetzung hierfür ist in allen Fällen jeweils eine maschinelle Beatmung, beim milden ARDS sowohl nicht-invasiv als auch invasiv mit einem CPAP bzw. PEEP von mindestens 5mmHg. Beim moderaten und schweren ARDS wird zur Applikation der Klassifikationskriterien stets eine invasive Beatmung mit einem PEEP $\geq 5\text{mmHg}$ gefordert. [2, 3, 5]

Die Bezeichnung der Acute Lung Injury (ALI) für alle Patienten mit einem Horowitz-Index \leq 300mmHg welche noch in den AECC-Definitionen existent und dementsprechend auch in der zitierten Literatur noch wiederholt anzutreffen ist, gilt demnach in diesem Zusammenhang als veraltet und wird im Folgenden nicht mehr verwendet und durch den Oberbegriff des ARDS ersetzt.

Zur Inzidenz in der Gesamtbevölkerung lässt sich bei großen regionalen Unterschieden der erhobenen Daten und einer Spanne der errechneten Inzidenzen von ca. 4 – 100/100.000 Personenjahren keine zuverlässige Aussage treffen. Zudem sind die in den letzten Jahrzehnten publizierten Studienergebnisse bei wiederholt geänderter ARDS-Definition nur eingeschränkt vergleichbar. [3, 6, 8-15]

In der internationalen, multizentrischen, prospektiven LUNG-SAFE-Studie, der bislang einzigen größeren Studie, im Rahmen derer die aktuelle Berlin-Definition als Grundlage der Datenauswertung verwendet wurde, wird die Inzidenz des ARDS unter allen intensivstationär aufgenommenen Patienten jedoch mit >10%, bei allen maschinell beatmeten sogar mit >23%, angegeben, was dieses Krankheitsbild zu einem der relevantesten in der Intensivmedizin macht. [6]

Dennoch ist die Letalität trotz intensiver Forschungsbemühungen, in Abhängigkeit vom Schweregrad, nach wie vor hoch (mild: 35%, moderat: 40%, schwer: 46%). [6] Durch weiterentwickelte Beatmungskonzepte und supportive Maßnahmen konnte diese im Gegensatz zu den 80er-Jahren des letzten Jahrhunderts gesenkt werden. Bei weiterhin fehlendem pharmakologischem Therapieansatz wurde in den vergangenen Jahrzehnten jedoch keine signifikante Verbesserung mehr erzielt.[3, 5, 8, 14, 16-18]

Zusätzlich zur hohen Krankenhausmortalität ist bei vielen der Betroffenen eine langanhaltende Minderung der Lebensqualität und der Erwerbsfähigkeit zu beobachten. [19-25]

1.2 ARDS - Pathogenese

Ätiopathogenetisch wird dem ARDS eine Inflammationsreaktion zugrunde gelegt, im Rahmen derer es, nach Epithel- (z.B. im Rahmen einer Pneumonie) oder Endothelschädigung (z.B. im Rahmen einer systemischen Inflammationsreaktion bei Sepsis) zur Aktivierung und Migration vor allem polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe kommt. Infolge dessen, kommt es durch Zunahme der Permeabilität der alveolokapillären Membran,

zur Ausbildung eines interstitiellen und im Verlauf intraalveolären Lungenödems. Durch Surfactant-Mangel und das dem Ödem geschuldet gesteigerte Eigengewicht der Lunge kommt es zudem zum Alveolarkollaps und der Ausbildung von Atelektasen. [3, 26-31]

Des Weiteren konnte die schädigende Wirkung einer Mucinhypersekretion im Rahmen eines ARDS experimentell nachgewiesen werden. [32] Physiologisch hat die bronchiale Schleimsekretion eine mechanische, chemische und immunologische Schutz- und Abwehrfunktion. Im aus Wasser (97%) und soliden Anteilen (3%), insbesondere Mucinen, Zellresten und Lipiden bestehenden Gel des Atemwegsmucus sammeln sich inhalierte Noxen und werden durch Hustenstoß und Zilienschlag aus dem Bronchialsystem befördert. [33]

1.3 Mucine – Produktion und Regulation

Mucine sind eine heterogene Gruppe großer Glykoproteine, welche sowohl als membrangebunden (z.B. MUC1, MUC3A/B, MUC4 und MUC11-18) als auch als sekretorisch (MUC2, MUC5AC/B-9) beim Menschen vorkommen. Den sekretorischen Mucinen kommt dabei eine tragende Rolle in Bezug auf Struktur und Funktionalität des Schleimes zu. Die im Atemwegssekrete des Menschen dominanten, und damit hier relevanten, Mucine sind MUC5AC und MUC5B. [33]

Durch Hypersekretion besagter Mucine, kommt es zur Erhöhung der Viskosität und damit zu einem erschwerten Abtransport. Dies ist bereits seit längerem als pathogenetischer Mechanismus chronischer Atemwegserkrankungen wie dem Asthma bronchiale, der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung und der zystischen Fibrose bekannt. [33, 34]

Für die MUC5AC-Produktion sind verschiedene Regulationsmechanismen bekannt. So konnte eine Anregung der Produktion durch proinflammatorische Cytokine (IL-1 β , IL-17A) über den NF- κ B Signalweg, Lipopolysaccharid (LPS) oder den Tumornekrosefaktor α (TNF- α) nachgewiesen werden. [35-38]

In Bezug auf das ARDS konnte im Mausmodell eine deutliche Hypersekretion von MUC5AC durch mechanische Ventilation induziert werden, während die MUC5B-Produktion im Vergleich zu Negativkontrolle weitgehend konstant blieb. Neben der gesteigerten Mucusviskosität zeigte sich bei Wildtyp-Mäusen, im Gegensatz zur Versuchsreihe mit muc5ac -/--Mäusen eine deutlich ausgeprägtere Inflammationsreaktion mit vermehrter Rekrutierung polymorphkerniger Neutrophiler, was auch eine immunologisch abträgliche Rolle der Mucinhypersekretion nahelegt. [32, 39]

Eine spezifische Pharmakotherapie zur Reduktion der MUC5AC-Produktion konnte bisher, trotz erster *in-vitro*-Ansätze [40-47], nicht entwickelt werden. Daher soll in der vorliegenden Arbeit ein weiterer potentieller therapeutischer Ansatzpunkt untersucht werden: eine mögliche posttranskriptionelle Regulation von MUC5AC durch microRNAs.

1.4 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind endogene, kurze, nicht-kodierende RNA-Moleküle mit einer Länge von 20-24 Nukleotiden, welche durch Bindung an komplementäre Basensequenzen im 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) spezifischer mRNAs in die posttranskriptionelle Genregulation eingreifen. [48]

Seit der Erstbeschreibung der miRNAs 1993 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* [49, 50] konnten mittlerweile auch im menschlichen Organismus über zweitausend miRNAs identifiziert werden, deren spezifische Funktionen jedoch teils noch unklar sind. Es wird jedoch geschätzt, dass mehr als 60% aller proteinkodierenden menschlichen Gene einer posttranskriptionellen Regulation durch miRNAs unterliegen, wobei eine einzelne miRNA an einer Vielzahl von Genen regulatorisch wirksam sein kann. [51]

Die die miRNA-Moleküle codierenden Gene liegen heterogen im menschlichen Genom verteilt. Etwa die Hälfte der derzeit bekannten miRNA-Gene liegen intragenisch, d.h. innerhalb anderer proteincodierender Gene, der Rest intergenisch, entfernt von bislang beschriebenen Genen.[52]

Die Biogenese der miRNAs (siehe Abbildung 1) beginnt im Zellkern mit der Transkription einer primären miRNA (pri-miRNA) von 200 bis zu mehreren Tausend Nukleotiden (nt) Länge durch die RNA-Polymerase II. Durch weitere Prozessierung durch die dsRNA-spezifische Rnase III Drosha entstehen hieraus sogenannte Vorläufer-miRNAs (pre-miRNA), haarnadelförmig strukturierte Moleküle von 60-100nt Länge, welche GTP-abhängig durch Exportin-5 in das Zytoplasma transportiert werden. Dort entstehen durch Ausschnitt aus den pre-miRNAs durch eine weitere Rnase III, Dicer, die reifen, kurzen miRNAs in Form eines RNA-Doppelstranges.

Der energetisch stabilere der beiden Stränge findet Eingang in den, neben der miRNA u.a. noch aus den Argonaut-Proteinen, Dicer, RNA-Helikasen und dem „trans-activation-responsive RNA binding protein“ (TRBP) bestehenden, „RNA induced silencing complex“ (RISC). Dieser bindet, gesteuert durch die miRNA, an spezifische mRNAs. Die kovalente Bindung zwischen miRNA und mRNA erfolgt über die 6-8 nt lange, am 5'-Ende der miRNA

lokalisierten „seed“-Region an die komplementäre Sequenz der mRNA. Eine vollständige Komplementarität ist hierbei nicht notwendig, ihr Grad hat jedoch Einfluss auf die weitere Regulation. So wird die mRNA bei vollständiger Komplementarität direkt abgebaut, bei unvollständiger wird ihre Translation gehemmt. [48, 51, 53-66]

1.5 Ziele der Arbeit

Zu Beginn der Experimente war nicht nur die Rolle der microRNAs in der Regulation von MUC5AC gänzlich unbekannt, auch die für die weiteren Untersuchungen entscheidende genaue Sequenz der 3'-UTR war nicht bekannt. In den Gendatenbanken war keine einheitliche Sequenz zu MUC5AC angegeben, sodass das erste Ziel der Arbeit die Untersuchung der Genstruktur von MUC5AC und die Determinierung der Länge und Sequenz der 3'-UTR war. Nach Erlangung dieser Kenntnis bestand das zweite Ziel in der Identifikation auf die MUC5AC-Expression regulatorisch wirksamer miRNAs *in vitro*.

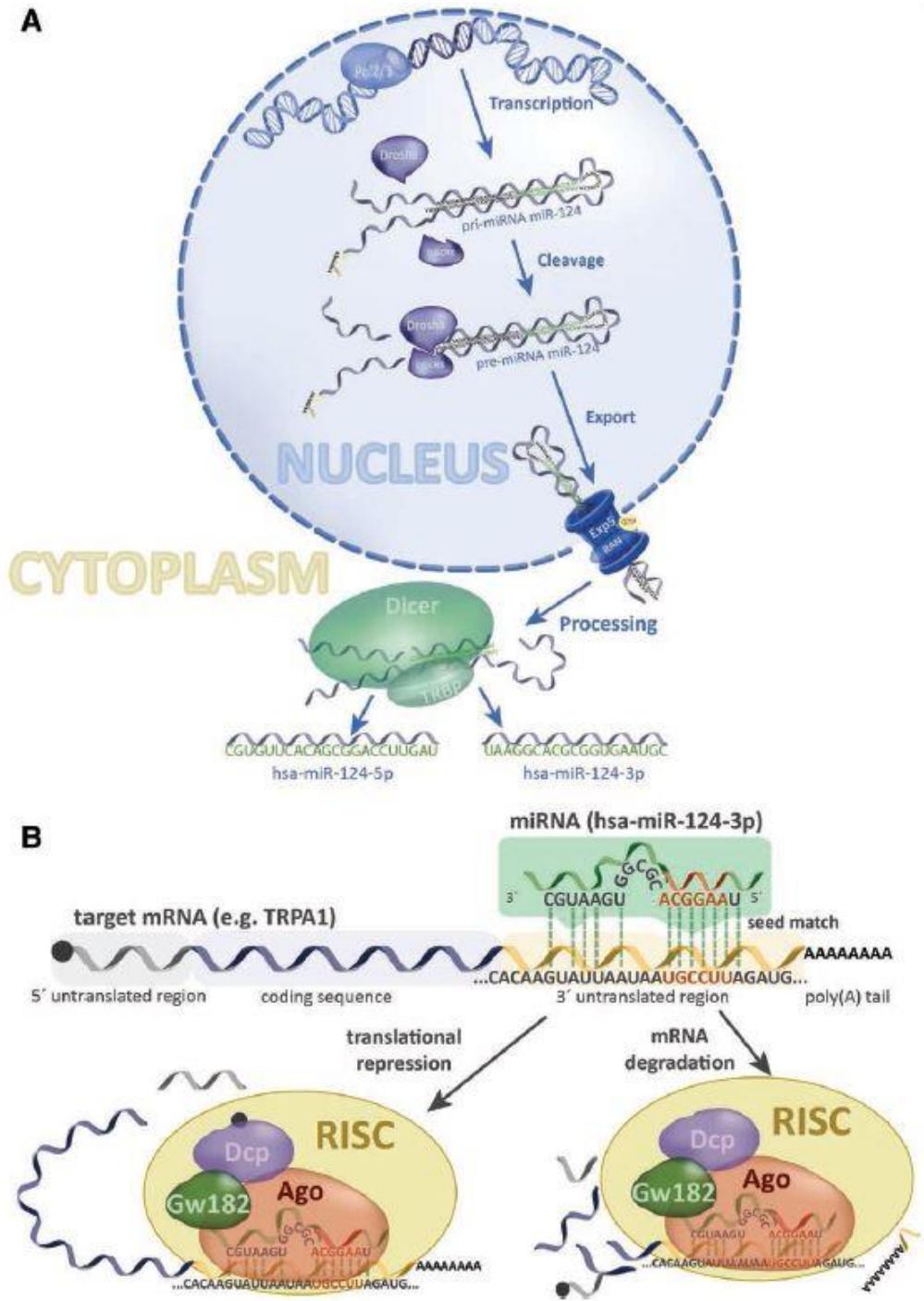


Abbildung 1: A: Schematische Darstellung der miRNA-Biosynthese. Transkription der miRNA-Gene durch die Polymerase 2/3, Prozessierung durch den Drosha-Komplex und Transport in das Zytosplasma durch Exportin-5. Ausschnitt der reifen miRNAs aus der pre-miRNA durch die RNase Dicer. B: Zielerkennung und Genregulation durch Integration in den RISC. [52]

2 Materialien

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

2.1.1 Geräte

Autoklav DE-45	Systec GmbH, Wettenberg
Eluator™ Vacuum 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
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Heizblock BT3	Grant Instruments (Cambridge) Ltd, Shepreth, GB
Light Cycler® 480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikroskop Modell IB	Exacta + Optech, San Prospero (MO), Italien
Mikrozentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrozentrifuge Centrifuge 5424 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
Multimode Microplate Reader Filter Max F3	Molecular Devices (Germany) GmbH, Biberach an der Riss
Neon™ Pipette	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Neon™ Transfection System	Invitrogen GmbH, Darmstadt
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
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
Vortexschüttler VF2	IKA®-Werke GmbH Co. KG, Staufen
Wasserbad SWB 25	Haake-Technik, Vreden
Wasserbad TW 20	JULABO GmbH, Seelbach
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge Megafuge 40R	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

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

Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
Pipettenspitzen, steril	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen, unsteril	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
Pipettenspitzen mit Filter, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reagenzrörchen 0,5 ml/ 1,5 ml, steril	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzrörchen 2 ml, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reagenzrörchen 1,5 ml, 2 ml, 5 ml, 13 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
Reagenzrörchen 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
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® Lightening 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 193a-3p	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt

TaqMan® MicroRNA Assay für
hsa-miR 92a-2-5p

Applied Biosystems Deutschland GmbH,
Darmstadt

TaqMan® MicroRNA Assay für Kontrolle U47

Applied Biosystems Deutschland GmbH,
Darmstadt

TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription
Kit

Applied Biosystems Deutschland GmbH,
Darmstadt

TURBO DNA-free™ Kit

Life Technologies 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
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose Serva Tablets (0,5 g/ Tablette)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche Diagnostics, Mannheim
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Lonza Cologne GmbH, Köln
DNA Ladder 100 bp	Promega GmbH, Mannheim
DNA Ladder 1 kb	Thermo Fisher scientific Inc., Waltham, USA
Ethanol 100% für Molekularbiologie	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol vergällt 80%	Apotheke Innenstadt, Universität München
Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Glycerol (100 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hefeextrakt SERVABACTER® pulverförmig	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin
Fast Start Essential DNA Probesmaster	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
New England Buffer 2 (10x)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main

Oligo-dT Primer	Qiagen GmbH, Hilden
ON-TARGETplus Non-targeting Pool	Fisher Scientific– Germany GmbH, Schwerte
ON-TARGETplus SMARTpool Human Dicer1-siRNA	Fisher Scientific– Germany GmbH, Schwerte
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
peqGREEN non-toxic DANN and RNA dye	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,4	Apotheke Innenstadt, München
Pre-miR™ miRNA Precursor Molecules	Life Technologies GmbH, Darmstadt
hsa-miR-193a-3p	
Pre-miR™ miRNA Precursor Molecules	Life Technologies GmbH, Darmstadt
hsa-miR-92a-2-5p	
Pre-miR™ miRNA Precursor Molecules	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Negative Control #1	
psiCHECK™-2 Vektor	Promega GmbH, Mannheim
Random Hexamers	Qiagen GmbH, Hilden
Restriktionsenzym <i>Pmel</i>	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
Restriktionsenzym <i>NotI</i>	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
RNaseOut™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen GmbH, Darmstadt
RPMI-Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
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
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer 5x, pH 8,3	Amresco Inc., Solon, USA
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt
Vi-Cell Reagent Pak	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

2.1.5 Selbsthergestellte Gele und Medien

Gele

1%iges Agarose-Gel

Agarose	1g
TBE-Puffer	100ml
Ethidiumbromid	7,5µl
<i>oder</i>	
peqGREEN	2µl

Medien

A549-Medium

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

LB-Medium (lysogeny broth)

Trypton	5 g
Natriumchlorid	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
ddH ₂ O	500 ml

LB-Agar

Trypton	5 g
Natriumchlorid	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
Agar	7,5 g
ddH ₂ O	500 ml

2.1.6 Primer

Primer für Real-Time-PCR und Universal Probe Library (UPL) Set, Human von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim		
Verwendete Real-Time-PCR-Primer und UPL-Sonden...		
UPL-Sonde	Primerbezeichnung	Sequenz
#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'
#42	B2M #42 forward	5'-TTC TGG CCT GGA GGC TAT-3'
	B2M #42 reverse	5'-TCA GGA AAT TTG ACT TTC CAT-3'
#18	MUC5AC #18 forward	5'-GTC ATC CAG CTG ACC AAG G-3'
	MUC5AC #18 reverse	5'-GAC CCC AGA CTG GCT GAA G-3'
#47	DICER1 #47 forward	5'-AGC AAC ACA GAG ATC TCA AAC-3'
	DICER1 #47 reverse	5'-GCA AAG CAG GGC TTT TCA T-3'
PCR-Primer		
MUC5AC_1 for		ATCAGGAACAGCTTCGAGGA
MUC5AC_2 for		CTAGTGGGAGAGCCATCAGC
MUC5AC_3 rev		CCTGGTGATCTCCTCAGGTC
MUC5AC_UTR_A_for		GTTAACACGACAGGAAGGATGAGTGC
MUC5AC_UTR_A_rev		GC GGCCGCTCCTGGTGTCTCACACTG
MUC5AC_UTR_B_for		GTTAACACGGACAGTGTGCAGCATCAAC
MUC5AC_UTR_B_rev		GC GGCCGCTGAGGGCTGAGGTAGGAGTG
MUC5AC_UTR_C_for		GTTAACACAGTCCAGGTATGTTCTCCG
MUC5AC_UTR_C_rev		GC GGCCGCGCTTGTGGTGTGGTGAC
MUC5AC_Seq_for		CTGGGAGTCCAGGTATGTT

MUC5AC_Seq_rev	CGTAGCAGTAGGAGGGGTTG
MUC5AC_Seq_HuRefVer1_for	GGACAAGATGCAGTGTGTGG
MUC5AC_Seq_HuRefVer1_rev	GGAGGTAGTTGGAGGAGTGG
MUC5AC_UTR_B2 forward	5'-GTTAACATGACCCTTCAGCACAG-3'
MUC5AC_UTR_B2 reverse	GCGGCCGCGCAACAGACTGGCCATGTAC
MUC5AC_Seq_Ver2_for	5'-TGCATCACCCAGGTCG-3'
MUC5AC_Seq_Ver2_rev	5'-CCTCTGTGTGGCTGCAGA-3
Sequenzierungsprimer	
PsiCheck 2	5'-ACC CTG GGT TCT TTT CCA AC-3'

2.1.7 Software

BLAST®	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Light Cycler® 480 Relative Quantification Software	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microsoft® Office 2013	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
NEBcutter Version 2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/
Primer3 Input Version 0.4.0	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Graphpad PRISM	GraphPad Software, La Jolla, California USA
EndNote X7	Thomson Reuters Deutschland GmbH, Frankfurt am Main

3 Angewandte Methoden

3.1 Zellkultur

Für die Versuche wurden humane Lungenepithezelzen der A549-Reihe (ATCC CCL-185) verwendet. Die Zelllinie der A549-Zellen entstammt einem humanen Adenokarzinom der Lunge und wurde, aufgrund ihrer guten Kultivier- und Handhabbarkeit, als allgemein etablierte Standardzellreihe für Zellkultur und Transfektionsexperimente auch für diese Arbeit gewählt.

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in einem speziellen Nährmedium (siehe 2.1.5) in 75T-Kulturflaschen der Firma Greiner Bio.

Zur Weiterverarbeitung oder Subkultivierung der Zellen wurde das Nährmedium abgesaugt, Reste mit PBS-Lösung ausgewaschen, der adhärente Zellrasen anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung gelöst, abzentrifugiert und in Medium resuspendiert.

Die Bestimmung der Zellzahl und –viabilität erfolgte durch eine Tryptanblaufärbung mit Hilfe des Vi-Cell XR Cell Viability Analyzers. Für das weitere Vorgehen wurde ausschließlich die Zahl der vitalen Zellen berücksichtigt.

Jegliche Arbeit an geöffneten Zellkulturflaschen oder –platten erfolgte unter einer Sterilwerkbank.

3.2 Transfektion mittels Elektroporation

Die Transfektion mittels Elektroporation erfolgte am Neon Transfection System der Firma Invitrogen mit folgenden Spezifikationen:

Zellen	Spannung	Pulsdauer	Anzahl der Pulse	Pipettenspitzen
A549	1230V	30ms	2	100µl
HEK	1100V	20ms	2	100µl

Zunächst wurden die Zielzellen gezählt, zentrifugiert und das Pellet im Resuspensionspuffer R des Neon Kits gelöst. Nach Hinzugabe der zu transfizierenden Agenzien, miRNA, siRNA oder Reportervektor, erfolgte die Transfektion.

Im Anschluss wurden die Zellen in Multiwellplatten für mindestens 24h inkubiert, Zeiten werden im Folgenden jeweils angegeben.

3.3 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA der verwendeten Zellen erfolgte mithilfe der Kits miRvana oder RNAqueous von Life Technologies gemäß den Angaben des Herstellers.

Anschließend wurde die RNA mit 30µl nukleasefreiem Wasser eluiert und einer Aufbereitung mit DNase unterzogen (Turbo DNA-free Kit, Life Technologies).

Dazu wurden der RNA-Lösung 5,5µl 10x DNase Puffer und 1µl Turbo DNase zugegeben und der Ansatz 30min bei 37°C inkubiert. Darauf folgend wurden 5,5µl DNase-Inactivation Reagent hinzugefügt und nach einer zweiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur eine Zentrifugation mit 16000*g durchgeführt. Der Überstand wurde in ein steriles Gefäß überführt und gekühlt.

Eine Messung des RNA-Gehalts der gewonnenen Lösung erfolgte spektralphotometrisch am NanoDrop 2000 bei 260nm Wellenlänge.

3.4 cDNA-Synthese

Aus den gewonnenen RNA-Proben wurde zur anschließenden Verwendung in der Realtime-PCR cDNA synthetisiert. Dies erfolgte unter Verwendung des SuperScript III Reverse Transcriptase-Kits nach Angaben des Herstellers.

RNA-Proben wurde eine konzentrationsabhängige Menge nukleasefreies H₂O zugesetzt, um jeweils 10µl Lösungen mit identischen RNA-Mengen zu erhalten.

Anschließend wurde folgender Versuchsansatz für 5min bei 65°C inkubiert:

10µl	RNA-Lösung
1µl	Random Hexamers
1µl	Oligo dTs
1µl	dNTPs

Nach der Inkubation wurden zu jedem Ansatz folgende Reagenzien hinzugefügt:

4µl	First strand Buffer
1 µl	0,1M DTT
1 µl	RNase Out
1 µl	SuperScript RTase

Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler in einem dreistufigen Temperaturverlauf:

5min	25°C
45min	50°C
15min	70°C

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei max. 4°C gekühlt gelagert.

3.5 Bestimmung der mRNA-Expression mittels Realtime-PCR

Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte in Duplikaten am Lightcycler 480 unter Verwendung der Housekeeping-Gene SDHA und B2M durchgeführt.

Dazu wurden pro Well 10ng cDNA mit 4,4µl nuklease-freiem Wasser versetzt und jeweils folgender Versuchsansatz beigemischt:

0,2µl Primer forward
0,2µl Primer reverse
480µl ProbesMaster
0,2µl UPL-Sonde

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

95°C	10min
50 Zyklen:	
95°C	10s
60°C	30s
72°C	60s
40°C	30s

3.6 3'RLM-RACE

Zur Amplifikation der 3'-UTR wurde eine 3'-RLM-RACE (RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA-ends) durchgeführt. Diese erfolgte unter Verwendung des FirstChoice RLM-RACE Kits in einem dreistufigen Prozess.

Zunächst erfolgte die reverse Transkription der RNA-Probe zur cDNA-Synthese unter folgendem Versuchsansatz:

10µl RNA-Probe (1µg)
4µl dNTP-Mix
2µl 3'RACE-Adapter
2µl 10x RT Buffer
1µl RNase Inhibitor
1µl M-MVL Reverse Transcriptase

Dieser Ansatz wurde für 60min bei 42°C im Thermocycler inkubiert.

Im Anschluss erfolgte eine Outer 3'RLM-RACE-PCR bei folgendem Versuchsansatz:

1µl cDNA
2.5µl Pfu Ultra 10x Buffer
4µl dNTPs
2µl 3'RACE Outer Primer
2 µl MUC5AC for-Primer
0.25µl Pfu II Ultra Polymerase
13.25µl Nukleasefreies Wasser

Anschließend wurde eine Inner 3'RLM-RACE-PCR mit folgendem Ansatz durchgeführt:

1µl Outer RACE-Produkt
5µl Pfu Ultra 10x Buffer
4µl dNTPs
2µl 3'RACE Inner Primer
2 µl MUC5AC for-Primer
0.25µl Pfu II Ultra Polymerase
35.75µl Nukleasefreies Wasser

Sowohl Outer- als auch Inner-RACE-PCR erfolgten unter Verwendung des folgenden Programms im Thermocycler:

94°C	3min
40 Zyklen:	
94°C	30s
Gradient (59-62°C)	30s
72°C	5min
72°C	7min

Das RACE-Produkt wurde im Agarose-Gel mittels Elektrophorese analysiert.

3.7 Klonierung StrataClone Kit

Die Klonierung von DNA in kompetente E.coli Stämme erfolgte unter Verwendung des StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kits, gemäß den Angaben des Herstellers, in 3 Schritten:

3.7.1 Polymerase Kettenreaktion

Zur Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnitts wurde zunächst eine konventionelle PCR unter Verwendung der im Kit enthaltenen PfuUltra II HS DNA Polymerase mit folgendem Versuchsansatz durchgeführt:

40,5 µl	ddH2O
5,0 µl	10× PfuUltra II Reaction Buffer
0,5 µl	dNTP mix (25 mM each dNTP)
1,0 µl	Template DNA (100 ng/µl)
1,0 µl	Primer #1 (10 µM)
1,0 µl	Primer #2 (10 µM)
1,0 µl	PfuUltra II fusion HS DNA Polymerase

Im Thermocycler wurden, sofern im Folgenden nicht explizit anders angeben, folgende Einstellungen vorgenommen:

95°C	2min
30 Zyklen:	
95°C	20s
55°C	20s
72°C	60s
72°C	3min

3.7.2 Ligation in Topovektor

Das PCR-Produkt wurde zur Ligation in den Topoisomerase-Vektor pSCB-amp/kan (StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit, Stratagene) in folgendem Versuchsansatz 30min bei Raumtemperatur inkubiert:

3µl	StrataClone Blunt Cloning Buffer
2µl	PCR-Produkt (5-50ng DANN)
1µl	StrataClone Blunt Vector Mix amp/kann

3.7.3 Transformation

Die Plasmide wurden mittels Transformation in E.coli Bakterien aufgenommen. Dazu wurde der Ligationsansatz mit 50µl der StrataClone Competent Cell Suspension gemischt und 20min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz für 45 Sekunden bei 42°C hitzegeschockt und erneut zwei Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von vorgewärmtem LB-Medium wurden die Zellen im Thermoschüttler für eine Stunde bei 37°C inkubiert um danach in Petrischalen mit ampicillinhaltigem LB-Agar bzw. in Flaschen mit ampicillinhaltigem Medium kultiviert und im Brutschrank inkubiert zu werden.

Das Ampicillin im Nährboden in Kombination mit dem entsprechenden auf dem Plasmid enthaltenen Resistenzgen sicherte die Selektion der erfolgreich klonierten Zellen.

3.8 Plasmidpräparation mit Mini- und Midiprep

Zur Plasmidpräparation aus E.coli wurden je nach vorhandener Zellzahl und zu erwartender DNA-Menge entweder das QIA Miniprep-Kit (Qiagen) oder das PureYield Midiprep-System (Promega) verwendet. War das so gewonnene Produkt zur direkten Sequenzierung vorgesehen (vorwiegend während der Untersuchungen der Genstruktur von MUC5AC), so folgten eine Gelelektrophorese, eine Aufreinigung (jeweils im Folgenden näher beschrieben) und ein Fremdversand zur Sequenzierung an MWG-Biotech (Ebersberg). Andernfalls folgte zunächst ein Restriktionsverdau.

3.9 Restriktionsverdau und Integration in den Reportervektor psiCHECK2

In der vorliegenden Arbeit wurden Plasmide mittels folgenden Reaktionsansatzes und einer einstündigen Inkubation im Wasserbad bei 37°C verdaut:

5 µL	10x NEBuffer
0,5 µL	100x BSA
1 µL	Restriktionsenzym 1 (10 U/µL)
1 µL	Restriktionsenzym 2 (10 U/µL)
1 µg	DNA
x µL	Nuklease-freies Wasser (bis Endvolumen: 50 µl)

Die 3'-UTRs wurden unter Verwendung der Restriktionsenzyme PmeI und XhoI in den Reportervektor psiCHECK-2 (Promega) integriert.

3.10 Gelelektrophorese und Auswertung

Die Elektrophorese dient der Trennung von elektromobilen Molekülen verschiedener Größe. In dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese zur Auf trennung von DNA in einem Agarosegel verwendet.

Zunächst wurde dazu ein PCR-Produkt zur Anfärbung mit 6x DNA Loading Dye versehen und in die Taschen des Gels gefüllt. Mittels einer Stromquelle (Power Pac Basic Electrophoresis Power Supply Unit, Bio-Rad Laboratories) wurde ein elektrisches Feld angelegt.

Die Auswertung erfolgte abhängig von der angelegten Feldstärke und dichte des verwendeten Agarosegels nach variablen Laufzeiten in der E-Box VX2 von Peqlab. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid bzw. peqGreen-Reagenz diente dem Nukleinsäurenachweis unter UV-Licht durch Verstärkung der Fluoreszenz. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte Anhand eines Komigrationsstandards (DNA ladder 100bp/1kb).

3.11 Wizard PCR Clean-up

Die Aufreinigung spezifischer DNA-Banden eines PCR-Produkts aus einem Agarosegel erfolgte mit dem Wizard PCR Clean-up Kit (Promega GmbH) nach Angaben des Herstellers.

Ein ausgeschnittenes Gel-Fragment wurde bei 55-65°C gelöst, mit Hilfe des Kits in mehreren Waschvorgängen gereinigt und mit nukleasefreiem Wasser eluiert. Der DNA-Gehalt der gewonnenen Lösung wurde spektralphotometrisch bestimmt.

3.12 Luciferase-Assay

Zur Bestimmung der Reporteraktivität wurden HEK-293-Zellen verwendet. 1×10^5 Zellen wurden mit 1 µg Reporterplasmid und mit 50 nM der entsprechenden premiR-Moleküle (PremiR miRNA Precursor Molecule, Applied Biosystems) co-transfiziert. Nach erfolgter Elektroporation mittels einer 10 µL-Transfektionsspitze wurden die Zellen 48h Stunden inkubiert. Zur Bestimmung der Aktivität der Reportergene Firefly- und Renilla-Luciferase wurde das Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) nach Angaben des Herstellers und das Luminometer MicroLumat Plus (Berthold Technologie) verwendet.

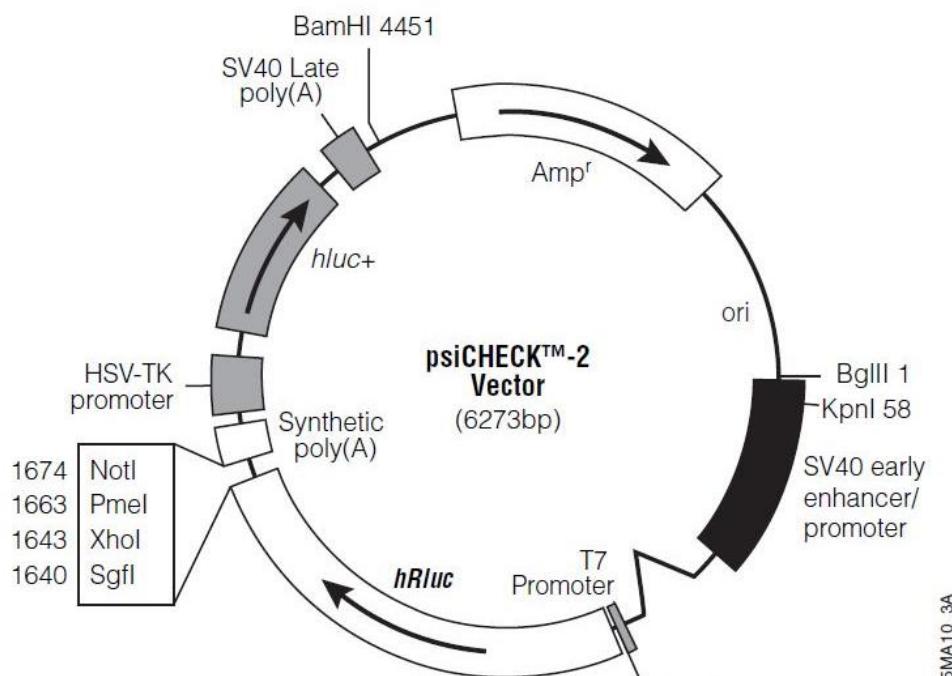


Abbildung 2: Schematische Darstellung des psiCHECK-2 Reporterkonstrukts. Nach Integration der 3'-UTR in den Vektor und Cotransfektion mit den betreffenden miRNAs wurde die Aktivitätsänderung der hRluc (Renilla-Luciferase) relativ zur konstitutiv exprimierten hluc+ (Firefly-Luciferase) bestimmt.

3.13 TaqMan

Zur Quantifizierung der miRNA-Expression in der verwendeten Zellreihe wurde ein TaqMan Micro-RNA Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Hierzu erfolgte zunächst eine Isolation der gesamt RNA aus unbehandelten A549-Zellen. Diese wurde mit folgendem Versuchsansatz unter Verwendung des TaqMan-MicroRNA Reverse Transcription Kits revers transkribiert:

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

Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler unter folgenden Einstellungen:

16°C	30min
42°C	30min
85°C	5min

Mit dem hieraus gewonnenen Produkt erfolgte eine qPCR unter Verwendung des TaqMan MicroRNA Assays für die miRNAs 193-3p und 92a-2-5p, sowie eine Referenzkontrolle U47, mit folgendem Versuchsansatz:

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

Die Untersuchung erfolgte im Lightcycler 480 mit folgenden Reaktionsbedingungen:

95°C 10min

40 Zyklen:

95°C 15s

60°C 60s

3.14 Statistische und bioinformatische Analysen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung der Software Graphpad PRISM (GraphPad Software). Die statistische Signifikanz mittels T-Test ermittelt.

Alle durchgeführten Versuche wurden mindestens in Triplikaten angelegt und die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) oder als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben und graphisch dargestellt.

Die potenziellen miRNA-Bindestellen wurden unter Verwendung der arbeitsgruppeneigenen miRNA-Datenbank *in silico* identifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der relativen Genexpression von MUC5AC nach Dicer-Knockdown

In der vorliegenden Arbeit sollte die posttranskriptionelle Regulation von MUC5AC durch miRNAs näher untersucht werden.

Zunächst wurde hierfür ein siRNA-vermittelter Knockdown gegen das Dicer-Protein in A549 Zellen durchgeführt. Das Dicer-Protein ist essentiell für die Synthese von miRNAs, daher können Knockdown-Versuche angewendet werden um die These der miRNA-abhängigen Regulation zu erhärten. Nach 48-stündiger Inkubation, anschließender RNA-Isolation und cDNA-Synthese zeigte sich in der qPCR eine wie erwartet supprimierte Dicer-Expression ($0,42 \pm 0,05$, im Vergleich zur Negativkontrolle), was den erfolgreichen Knockdown belegt (siehe Abbildung 3). Zusätzlich konnte eine signifikante Steigerung der MUC5AC-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle ($1,34 \pm 0,07$) verzeichnet werden. Dieses Resultat zeigt, dass MUC5AC einer Dicer-abhängigen Regulation durch miRNAs unterliegt.

Im Folgenden sollten nun potentiell in der 3'-UTR von MUC5AC bindende miRNAs identifiziert und auf ihr regulatorisches Potential untersucht werden.

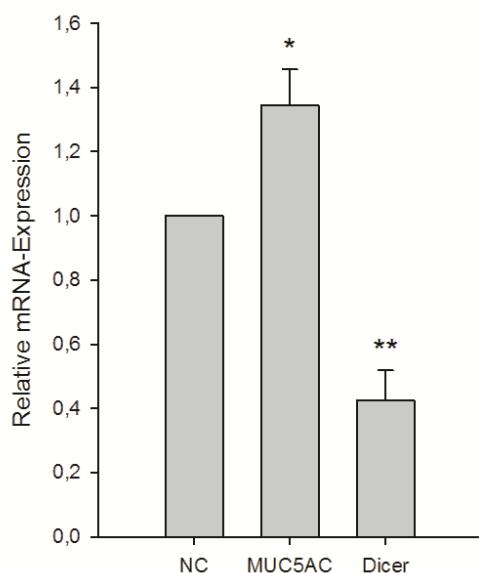


Abbildung 3: Relative mRNA-Expression von MUC5AC und Dicer in A549-Zellen. RNA wurde nach Transfektion mit siRNA gegen Dicer aus A549-Zellen isoliert. Die relative Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle wurde mittels qPCR untersucht und abgebildet. Mittelwert \pm SD, n = 3. MUC5AC: P < 0,05, Dicer: P < 0,01.

4.2 MUC5AC-Genstruktur

4.2.1 Ausgangssituation

Zur Identifikation potentiell regulatorisch wirksamer miRNAs war die Kenntnis der Sequenz der 3'-UTR der mRNA von MUC5AC unerlässlich. Zu Beginn der Experimente existierte jedoch keine eindeutige Darstellung in den Gen-Datenbanken. Vielmehr gab es zwei verschiedene Angaben zu Sequenz und Länge der mRNA, einmal ca. 2500 (GRCh37) und einmal ca. 6000 (HuRef) Nukleotide lang, die sich in ihrem Beginn jedoch stark ähnelten. Zu diesen Sequenzen fand sich jeweils keine Angabe einer 3'-UTR, allerdings beherbergten bei Datenbanken je eine, sich nur minimal von der jeweils anderen unterscheidenden, Sequenz namens MUC5AC-like, inklusive identischer 3'-UTRs, je ca. 650 Basenpaare lang. (siehe Abbildung 4)

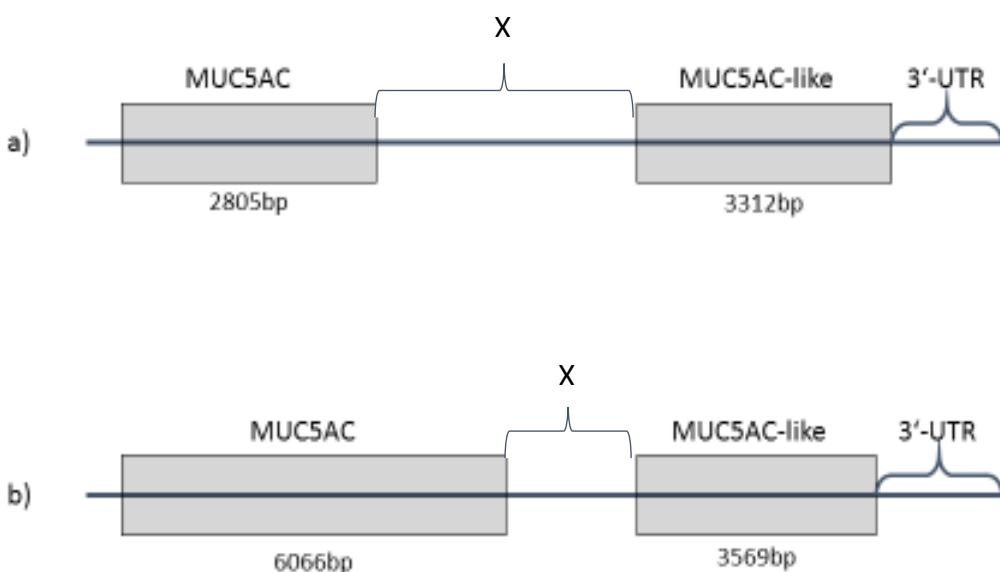


Abbildung 4: Schematische Darstellung der unterschiedlichen mRNA-Sequenzen für MUC5AC in den Gen-Datenbanken Anfang 2013. (a: GRCh37, b: HuRef), X: unbekannter Genabschnitt zwischen MUC5AC und MUC5AC-like

4.2.2 Überprüfung einer Überlappung von MUC5AC und MUC5AC-like

Da die Sequenzen des Downstream-Endes MUC5AC in der HuRef-Darstellung und des Beginns von MUC5AC-like große Ähnlichkeit aufwiesen, postulierten wir eine Überlappung der beiden Genabschnitte. Nach Entwurf entsprechender Primerpaare (siehe Abbildung 5) erfolgte die Amplifikation des fraglichen DNA-Abschnittes mittels konventioneller PCR.

Hierbei war im Versuchsansatz mit den Primern MUC5AC_1 for + MUC5AC_3 rev ein PCR-Produkt mit einer Länge um 3-4 kbp zu erwarten, dessen Amplifikation jedoch nicht gelang.

Im Versuchsansatz mit dem Primerpaar MUC5AC_2 for + MUC5AC_3 rev hingegen gelang die Amplifikation mehrerer Produkte (siehe Abbildung 6). Die Länge der in silico vermuteten Überlappung betrug etwa 300 bp, die entsprechend des Primerdesigns erwartete Länge des PCR-Produktes etwa 500 bp, entsprechend der Bande 4 aus Abbildung 6. Auch gelang nur mit dem Produkt der Bande 4 eine Klonierung und Sequenzierung, womit sich der Verdacht einer Überlappung zwischen MUC5AC und MUC5AC-like bestätigte, sodass von nun an von der in Abbildung 7 schematisch dargestellten Struktur, eines aus den vorbeschriebenen Sequenzen von MUC5AC und MUC5AC-like zusammengesetzten, langen MUC5AC-Gens ausgegangen wurde.

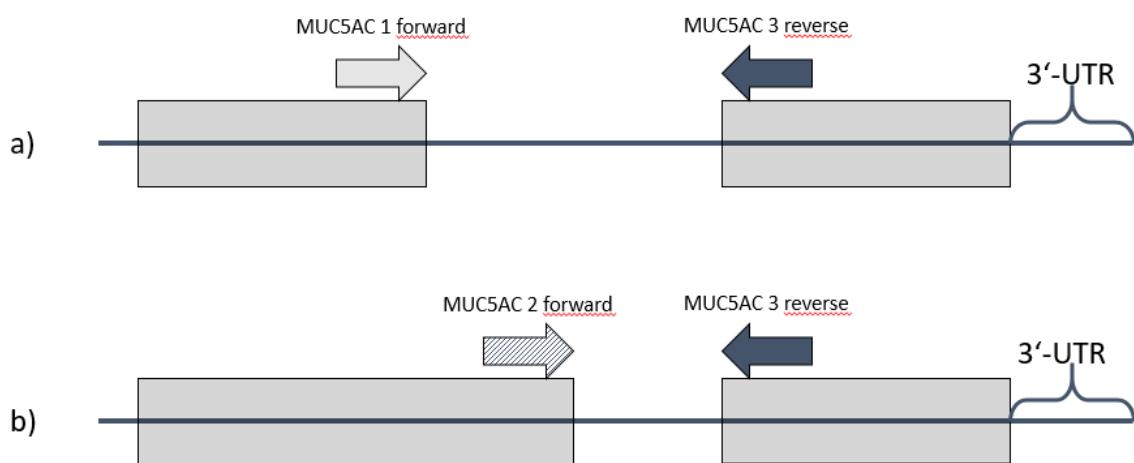


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Sequenzierungsprimer, deren Design zur Verifizierung der Annahme eines möglichen Overlaps zwischen MUC5AC und MUC5AC-like dienen sollte. (mRNA-Sequenzen der a: GRCh37- und b: HuRef-Datenbank)

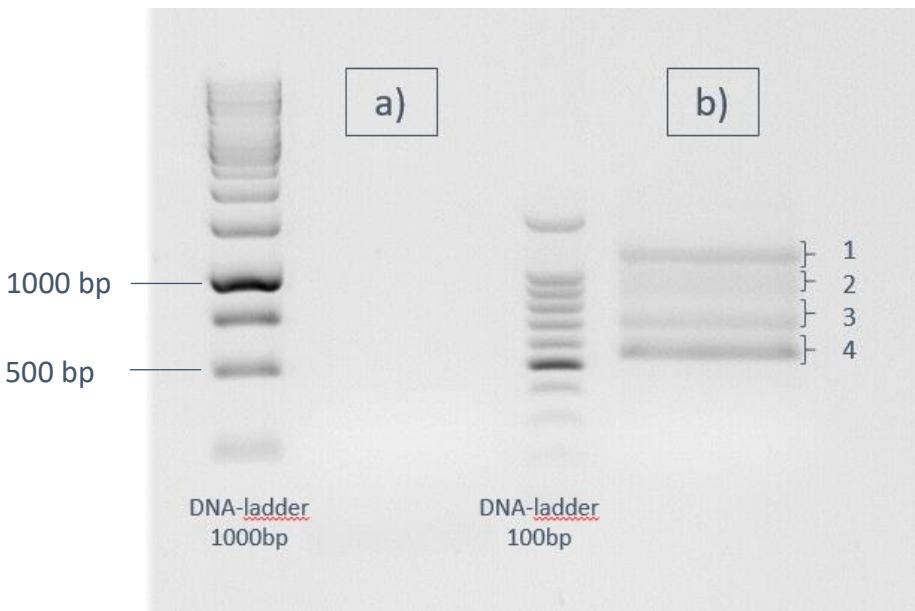


Abbildung 6: Gelelektrophorese nach PCR der intergenetischen Region zwischen MUC5AC und MUC5AC-like. Während in Versuchsansatz a) (siehe Abbildungen 5) keine Banden sichtbar sind, finden sich in Versuchsansatz b) 4 Banden unterschiedlicher Größe.

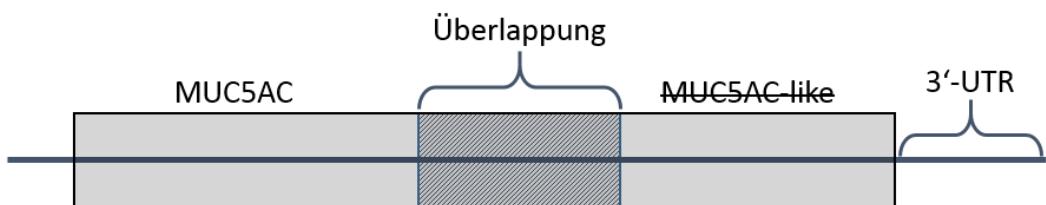


Abbildung 7: Schematische Darstellung der angenommenen MUC5AC-Struktur nach Sequenzierung des intergenetischen Abschnittes zwischen MUC5AC und MUC5AC-like. Da die postulierte Overlap-Region zwischen den beiden Genen der Datenbanken nachgewiesen werden konnte, wurde von nun an von einem einzigen Gen ausgegangen und nicht länger zwischen MUC5AC und MUC5AC-like unterschieden.

4.2.3 Ermittlung der Länge der 3'-UTR

Weiterhin unklar war jedoch die Länge der 3'-UTR, da sich die Darstellungen von MUC5AC-like in den verschiedenen Darstellungen der Datenbanken zwar weitgehend entsprachen, jedoch in der Zwischenzeit eine weitere Version von MUC5AC Eingang in die Gendatenbanken fand (CHM1_1.1). Diese entsprach der HuRef-Darstellung weitgehend, enthielt jedoch einen zusätzlichen, ca. 200 bp langen Gen-Abschnitt, der seinerseits ein früheres Stopcodon enthielt und somit zu einer deutlich längeren 3'-UTR geführt hätte.

Dieser Abschnitt wurde mittels eines neuen Primerpaars ebenfalls durch PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert.

Durch den Nachweis der Existenz des fraglichen Genabschnittes, entsprach fortan die 2118 nt lange 3'-UTR der Arbeitshypothese. (siehe Abbildung 8)

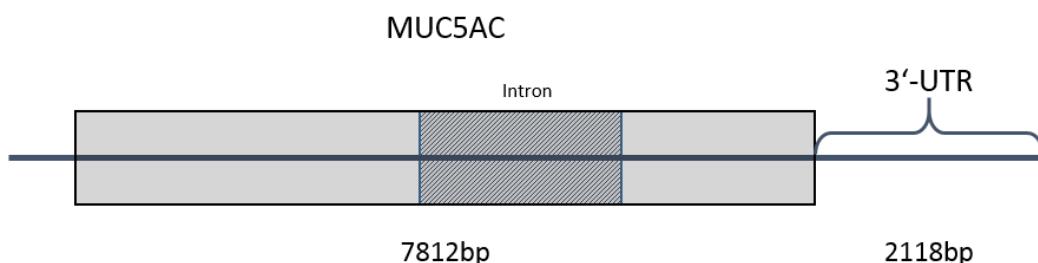


Abbildung 6: Schematische Darstellung der ermittelten MUC5AC-Struktur: Es wurde von nun an auf mRNA-Ebene, nach Spleißen, von einem 7812 Basenpaaren langem Gen ausgegangen. Die Länge der 3'-UTR wurde, nach erfolgreicher Sequenzierung des früheren (upstream) Stop-Codons, mit 2118 Basenpaaren bestimmt.

4.2.4 Sequenzierung der 3'-UTR

Zur Determinierung potentieller miRNA-Bindestellen war nun die Sequenzierung der vollständigen 3'-UTR notwendig. Zur Amplifikation wurde zunächst das Verfahren der 3-RACE-PCR angewendet, im Rahmen dessen der poly(A)-Schwanz der mRNA durch Verwendung eines

oligo(DT)-Primers als Startpunkt für die PCR dient und somit die gesamte UTR in den Amplifikationsprozess eingeschlossen wird. Auch wird mit dieser Methode die Sicherheit gewonnen, dass es sich tatsächlich um das 3'-Ende der mRNA handelt und nicht eine unvollständige Sequenz vorliegt.

Aufgrund der großen Länge (2118 nt) gelang es nicht die gesamte 3'-UTR am Stück zu sequenzieren, sodass stattdessen eine 3'-RACE-PCR am Ende der 3'-UTR, sowie mehrere, überlappende PCRs über den Rest vorgenommen wurden.

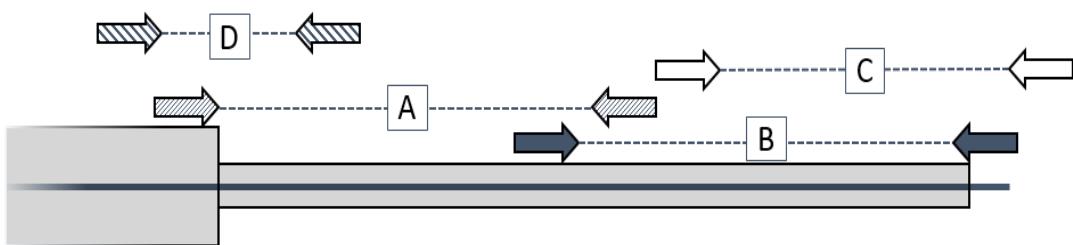


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Primer zur Amplifikation und ggf. Sequenzierung der 3'UTR. Die Primerpaare A und B wurden zur Amplifikation sowie Klonierung der 3'UTR in Psi-Check2-Vektoren verwendet. Primerpaar C entspricht den für die 3'-RACE-PCR verwendeten Primern. Primerpaar D wurde zur Sequenzierung der Region um das bis dahin fragliche Stop-Codon verwendet.

4.3 Bioinformatische Identifikation potentiell regulierender miRNAs

Mit der nun bekannten Sequenz der 3'-UTR wurden bioinformatisch potentielle Bindungsstellen regulierender miRNAs detektiert. Als vielversprechendste Kandidaten wurden die miRNA 193a-3p mit Bindestellen ab den Positionen 723, 1749 und 2080 der 2118 Nukleotiden langen UTR (also sowohl in Abschnitt A als auch in B/C der Abbildung 6) und die miRNA 92a-2-5p mit Bindestellen ab den Positionen 42, 57, 87, 117 und 1153 (Ausschließlich im Abschnitt A nach Abbildung 6) bestimmt.

4.4 Untersuchung der relativen Genexpression nach Transfektion mit miRNA

Zur Überprüfung einer Beteiligung der in silico ermittelten miRNAs an der Regulation von MUC5AC wurden zunächst Transfektionsexperimente durchgeführt.

A549-Zellen wurden mit PremiR-193a-3p- bzw. 92a-2-5p-Molekülen mit entsprechenden Negativkontrollen transfiziert und für 48h inkubiert.

In der qPCR zeigte sich eine Reduktion der MUC5AC-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle auf $0,33 \pm 0,03\%$ nach Transfektion mit der miR 193a-3p und auf $0,69 \pm 0,07\%$ nach Transfektion mit der miR 92a-2-5p. Dies zeigte eine direkte oder indirekte Regulierung von MUC5AC durch beide der verwendeten miRNAs.

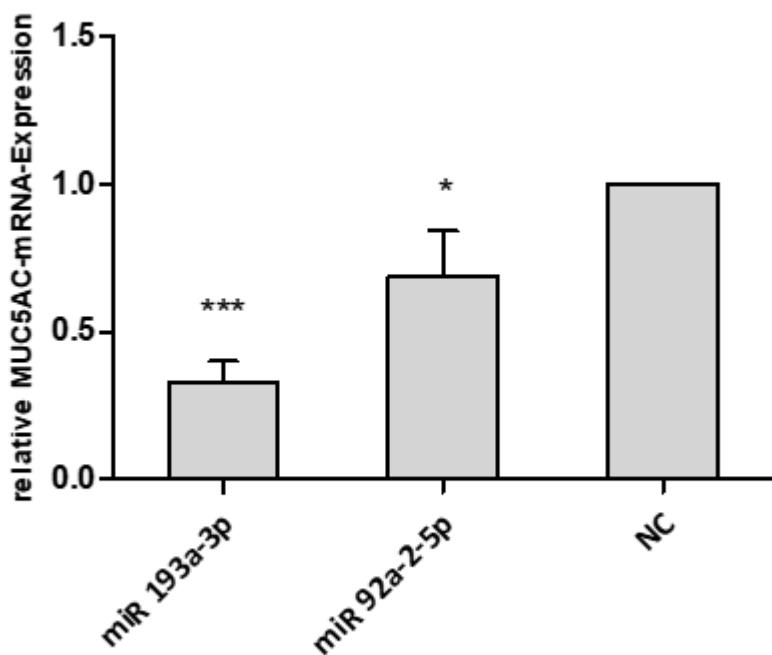


Abbildung 8: Relative MUC5AC-mRNA-Expression nach miRNA-Transfektion.

A549-Zellen wurden mit den angegebenen premiR-Molekülen bzw. einer Negativkontrolle transfiziert und die relative MUC5AC-Expression nach 48h Inkubationszeit mittels qPCR untersucht. Die Ergebnisse wurden relativ zur Negativkontrolle dargestellt. Mittelwert \pm SD. n = 5; miR 193a-3p: P < 0,0001, miR 92a-2-5p: P < 0,05

4.5 Luciferase-Assays

Zum Nachweis einer direkten miRNA-Wirkung am 3'-UTR von MUC5AC wurden Luciferase-Reporter-Assays verwendet. Aufgrund der großen Länge der UTR wurde diese in zwei Abschnitten in Reporterplasmide kloniert. (Abschnitt A+B, siehe Abbildung 9)

Verwendet wurde der psiCHECK-2-Reportervektor von Promega. Er enthält zwei synthetische Luciferase-Reportergene, die Renilla reniformis-Luciferase (Rluc) sowie die Photinus pyralis (Firefly)-Luciferase (hluc+). Dabei ist nur die Expression der Rluc durch die Bindung einer miRNA an den klonierten 3'-UTR reguliert, die hluc+ wird davon unabhängig exprimiert und dient als interne Kontrolle, auf welche die Rluc-Expressionsveränderungen bezogen werden. Es wurden jeweils A549-Zellen mit den psiCHECK-3'UTR-Reporterkonstrukten und miR 193a-3p oder miR 92a-2-5p co-transfiziert. Bei UTR-Abschnitt A (vorderer Abschnitt) zeigte sich bei Transfektion mit miR 193a-3p eine Reduktion der Luciferase-Aktivität auf $0,85 \pm 0,03$, bei Transfektion mit miR 92a-2-5p auf $0,77 \pm 0,04$. Bei Abschnitt B gelang mit der miR 193a-3p kein Nachweis signifikanter Expressionsveränderungen, die miR 92a-2-5p hat in diesem Abschnitt keine potentiellen Bindungsstellen und wurde daher nicht getestet.

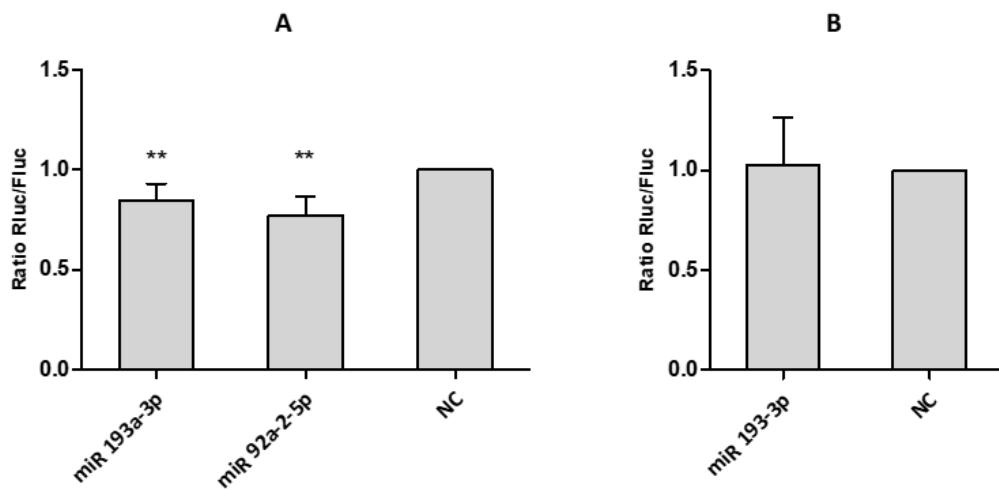


Abbildung 9: Luciferase-Aktivität nach Co-Transfektion der jeweiligen miRNA bzw. Negativkontrolle mit dem in den psiCheck2-Reportervektor klonierten 3'-UTR-Abschnitt. (A: vorderer (upstream) Abschnitt des UTR, B: hinterer (downstream) Abschnitt des UTR). Die Aktivitätsveränderungen werden auf die konstitutiv exprimierte hluc+ normiert. Mittelwert \pm SD. A: n = 6; miR 193a-3p: P < 0,01, miR 92a-2-5p: P < 0,01. B: n = 3 P > 0,05.

4.6 Untersuchung der Expression der untersuchten miRNAs in A549-Zellen

Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung der ermittelten Regulation von MUC5AC durch miR 193a-3p und 92-2-5p wurde ein TaqMan-Assay in unbehandelten A549-Zellen durchgeführt.

Dabei zeigte sich eine Expression der miR 193a-3p in der untersuchten Zellreihe. Für miR 92-2-5p konnte hingegen keine Expression nachgewiesen werden.

5 Diskussion der Ergebnisse

Das akute Lungenversagen (ARDS) ist ein in der Intensivmedizin häufiges, lebensbedrohliches und nach aktuellen Studien deutlich unterdiagnostiziertes Krankheitsbild. Abseits optimierter Beatmungs- und Lagerungsstrategien konnte bislang trotz umfassender Bemühungen keine spezifische pharmakologische Therapie etabliert werden.[3, 5, 6, 8, 14]

Im Mausmodell konnte eine im Rahmen des ARDS schädliche Wirkung einer Mucushypersekretion nachgewiesen werden. Das für die Expression des in den menschlichen Atemwegen dominanten Mucins verantwortliche Gen, für das auch eine deutliche Hyperexpression in akuten Inflammationsreaktionen nachgewiesen werden konnte, ist MUC5AC.[32, 34, 39] In der vorliegenden Arbeit sollte nun eine mögliche posttranskriptionelle Regulation durch miRNAs als potentieller Ansatzpunkt für eine weitere Therapieentwicklung untersucht werden.

MiRNAs sind kleine, nicht-codierende RNA-Moleküle, die durch Bindung an die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) spezifischer mRNA-Stränge in die Genregulation eingreifen. Zunächst erfolgte ein Knockdown-Versuch gegen die für die miRNA-Biogenese unerlässliche RNase Dicer. [48] In den so behandelten Zellen konnte eine relative Überexpression von MUC5AC in der qPCR festgestellt werden.

Da eine direkte Regulation durch miRNAs in einer Hemmung des Zielgens durch Degradation oder Unterdrückung der Ziel-mRNA besteht, konnten diese Ergebnisse als klares Indiz für eine miRNA-Regulation von MUC5AC herangezogen werden.

Zur Detektion potentiell regulierender miRNAs war es jedoch zunächst notwendig Kenntnis von der genauen Basensequenz der 3'-UTR von MUC5AC zu erlangen, um potentielle Angriffspunkte ermitteln zu können.[53]

Da jedoch zu Beginn der Versuchsplanung keine vollständige Gensequenz von MUC5AC in den Gendatenbanken vorlag, sondern sich hier nur bruchstückhafte Einträge über mehrere vermutete Gene, MUC5AC und MUC5AC-like, finden ließen, waren zunächst ausgedehnte Versuchsreihen zur Ermittlung der Genstruktur notwendig, um eine Grundlage für die Identifikation potentiell regulierender miRNAs zu schaffen.

Da MUC5AC, als codierendes Gen eines Makromoleküls selbst eine große Länge besitzt, war eine Amplifikation des Gens mit Sequenzierung, aufgrund der schieren Ausdehnung des Produktes, nicht möglich. Daher wurden die, sich in den verschiedenen Datenbanken entsprechenden und allenfalls in der Länge unterscheidenden, bekannten Bruchstücke von

MUC5AC und MUC5AC-like als Basis verwendet um durch Sequenzierung fehlender und kritischer Regionen Rückschlüsse auf die Gesamtgenstruktur ziehen zu können.

Zunächst fiel eine große Ähnlichkeit der Basenfolgen am Downstream-Ende von MUC5AC und dem Upstream-Ende von MUC5AC-like auf. Mittels einer konventionellen PCR konnte eine Überlappung und damit ein nahtloser Übergang von MUC5AC und MUC5AC-like nachgewiesen werden. Damit war nun klar, dass die 3'-UTR von MUC5AC am 3'-Ende des bisher als MUC5AC-like benannten Genes zu finden sein musste.

Eine kritische Unklarheit bestand nach Klärung der Lage der UTR jedoch noch in Bezug auf deren Länge. Da in den beiden unterschiedlichen vorbekannten Versionen von MUC5AC nur in einer von beiden Versionen ein Genabschnitt vorlag, der in der Folge zu einer, im Gegensatz zur anderen Version, Verschiebung des Leserasters und einem deutlich früheren Stop-Codon geführt hätte. Da dieser Genabschnitt nur eine Länge von etwa 200bp aufwies gelang die Amplifikation mittels PCR. Nach anschließender Sequenzierung war seine Existenz im Gen MUC5AC nachgewiesen, sodass nun von der langen UTR-Version von etwa 2000nt Länge ausgegangen werden konnte. Aufgrund dieser für eine 3'-UTR ungewöhnlichen Ausdehnung gelang auch hier eine Gesamtamplifikation mittels 3'-RLM-RACE nicht. Stattdessen wurde die 3'-UTR unter Verwendung mehrerer Primerpaare mit konventionellen PCRs und einer verkürzten 3'-RLM-RACE über ihre gesamte Länge sequenziert.

In der so ermittelten Sequenz konnten nun bioinformatisch potentielle miRNA-Zielregionen detektiert werden. Die miRNAs mit den meisten errechneten Bindestellen in dieser 3'-UTR waren die miR 193-3p und die miR 92a-2-5p.

Mit diesen miRNAs erfolgten nun Transfektionsexperimente zur Detektion der relativen mRNA-Expression von MUC5AC nach Exposition gegenüber den benannten miRNAs. Für beide miRNAs zeigte sich in der qPCR eine signifikante Suppression der MUC5AC-mRNA, womit eine Regulation durch diese beiden miRNAs nachgewiesen war.

Mit der bloßen Transfektion der miRNA konnte jedoch noch nicht zwischen einer direkten und indirekten Regulation unterschieden werden. Denkbar wäre hier auch ein Eingriff in andere Signalwege gewesen, da MUC5AC bekanntermaßen durch viele proinflammatorische Faktoren beeinflusst wird.[35-38]

Zum Nachweis einer Regulation an der 3'-UTR wurden daher Versuche mittels Luciferase-Reporter-Assays angeschlossen. Hierzu musste die 3'-UTR in den psiCHECK2-Vektor integriert werden. Dieser enthält neben einem Resistenzgen gegen Ampicillin zur Selektion der

erfolgreich klonierten Zellen zwei Luciferase-Gene, eines davon konstitutiv exprimiert, das andere in Abhängigkeit von der integrierten UTR.

Die Integration der UTR bereitete aufgrund ihrer großen Länge (2118 bp) erneut Schwierigkeiten, sodass eine Aufteilung auf zwei Konstrukte, eines mit der vorderen, eines mit der hinteren Hälfte der UTR notwendig wurde. Auch hier zeigte sich bei Cotransfektion des UTR-Reporterkontruktes mit den fraglichen miRNAs jeweils eine signifikante Suppression der Luciferase-Aktivität, was als Nachweis einer direkten miRNA-Regulation durch die miRNAs 193-3p und 92a-2-5p an der 3'-UTR von MUC5AC gewertet werden konnte. Bemerkenswerterweise war, als nächträglicher Beleg für die Richtigkeit der langen UTR-Variante, eine signifikante Aktivitätsänderung bei Co-Transfektion mit dem vorderen UTR-Abschnitt zu messen.

Zur Überprüfung der biologischen Relevanz in der A549-Zellreihe wurde die miRNA-Expression der beiden fraglichen miRNAs mittels Taq-Man-Assay untersucht, wobei nur für die miRNA 193-3p eine Expression in unbehandelten A549-Zellen nachgewiesen werden konnte.

Die Zusammenschau der Ergebnisse macht eine posttranskriptionelle Regulation von MUC5AC durch die miRNA 193-3p in A549-Zellen sehr wahrscheinlich.

Die vorliegende Arbeit kann damit als Grundlage für weiterführende Untersuchungen verwendet werden, insbesondere sind noch zellfunktionelle Untersuchungen nach miR-Transfektion notwendig. Da Versuche mit den Karzinomzellen der A549-Reihe nur eine eingeschränkte Aussagekraft bezüglich der Relevanz *in vivo* haben, sind dahingehend weitere Versuchsreihen mit primären humanen Epithelzellen und natürlich *in vivo* notwendig.

Es sind mittlerweile zahlreiche weitere miRNAs identifiziert worden, die eine Rolle insbesondere in der Regulation der Inflammationsreaktion und auch der Expression von MUC5AC, jedoch indirekt durch Eingriff in die immunologischen Signalkaskaden, im Rahmen des ARDS spielen könnten.[52, 67-70] In der vorliegenden Arbeit konnte nun jedoch erstmalig eine direkte miRNA-Regulation von MUC5AC *in vitro* nachgewiesen werden, was eine Basis für die Entwicklung miRNA-basierter Therapiestrategien für das ARDS bildet. Derzeit steckt diese Entwicklung noch in den Anfängen, erste Versuche mit miRNA-Imitatoren oder – Inhibitoren fanden jedoch bereits Eingang in klinische Studien. Es zeichnet sich ab, dass die höchsten noch zu überwindenden Hürden bis zur Implementierung miRNA-basierter Therapiekonzepte die Entwicklung von Möglichkeiten zur zellspezifischen Aufnahme der

miRNAs und die Reduktion unerwünschter Wirkungen sowie der toxischen Nebenwirkungen der Transportmoleküle sein werden.[52, 71-79]

Ist der Weg zur miRNA-basierten Therapie einmal geebnet, könnte diese eine der vielversprechendsten Perspektiven für die moderne Medizin bieten. Auch in diesem Falle könnte eine erfolgreiche, lungenspezifische Verstärkung der Wirkung der miRNA 193-3p künftig zu einer Senkung der Mortalität eines der häufigsten und bedrohlichsten Krankheitsbilder der Intensivmedizin beitragen.

6 Zusammenfassung

Das akute Lungenversagen (ARDS) ist ein in der Intensivmedizin häufiges, lebensbedrohliches und nach wie vor mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiertes Krankheitsbild. Eine spezifische Pharmakotherapie zur Behandlung des ARDS konnte bislang trotz umfassender Bemühungen nicht entwickelt werden.

Die Hypersekretion von Mucinen, insbesondere des in den menschlichen Atemwegen dominanten Mucins MUC5AC, ist nach neuesten Erkenntnissen in diesem Rahmen ein prognoseverschlechternder Faktor, dessen Regulationsmechanismen jedoch weitgehend unklar sind. In der vorliegenden Arbeit sollte daher eine mögliche posttranskriptionelle Regulation des Mucins MUC5AC durch miRNAs untersucht werden.

MiRNAs, kleine nicht-codierende RNA-Moleküle sind an der Genregulation beteiligt. Durch Bindung an spezifische komplementäre Bindestellen in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA kommt es durch Degradation oder Translationshemmung zu einer Suppression des betreffenden Gens.

Zur Identifikation potentiell MUC5AC regulierender microRNAs war es daher notwendig Kenntnis von der Basensequenz der 3'-UTR zu erlangen, die initial, wie der Großteil der Genstruktur, unbekannt war. Zunächst waren den Gendatenbanken Sequenzen für zwei benachbarte, unterschiedliche Gene, MUC5AC und MUC5AC-like zu entnehmen. Diese vorbestehende Hypothese zweier separater Gene konnte im Rahmen dieser Arbeit in umfassenden Untersuchungen, unter Verwendung multipler PCRs, 3'RLM-RACE-PCRs und RNA-Sequenzierungen, widerlegt werden. Stattdessen wurde ein neues Genstrukturmodell von MUC5AC, inklusive einer etwa 2000nt langen 3'-UTR, etabliert.

Anhand der ermittelten Sequenz konnten bioinformatisch potentiell an der Regulation von MUC5AC beteiligte miRs, 193-3p und 92a-2-5p, identifiziert werden.

In den folgenden Untersuchungen mittels Realtime-PCR und Luciferase-Assays konnte für beide untersuchten microRNAs eine Suppression von MUC5AC beobachtet werden. Allerdings zeigte sich in der Quantifizierung der miRNA-Expression mittels TaqMan-Assay in A549-Zellen lediglich eine Expression der miRNA 193-3p.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine direkte Regulation von MUC5AC durch die miRNA 193-3p in Lungenepithelzellen. Obwohl weitere Studien bezüglich der Relevanz *in vivo* notwendig sind, könnten diese Erkenntnisse eine Grundlage für künftige pharmakologische Strategien zur Senkung der Mucinsekretion im Rahmen des ARDS darstellen.

7 Summary

The acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a life threatening condition, associated with high morbidity and mortality. In spite of extensive research towards specific pharmacological therapies of ARDS, none could be developed to date.

Recent studies suggest, that an increased secretion of airway mucins, specifically of MUC5AC, the predominant mucin in human airways, plays a detrimental role during ARDS. Today it is still unclear by which mechanisms this secretion is regulated.

The goal of this study was to investigate whether MUC5AC is regulated on a posttranscriptional level by miRNAs.

MiRNAs, small non-coding RNA molecules engage in gene regulation by binding to complementary sites in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of mRNAs and thus downregulating gene expression by either mRNA cleavage or translational repression.

In order to identify miRNAs with regulatory potential to MUC5AC, it was crucial to obtain the 3'-UTR's base sequence that initially, as most of the gene's structure, was still unknown.

At that point, gene databases offered sequences for two different genes in the MUC5AC-region, MUC5AC and MUC5AC-like. Through extensive analysis, using a variety of methods, including PCR, 3'RLM-RACE-PCR and RNA sequencing, the preexisting hypothesis of two separate genes could be disproven and a new model of MUC5AC, including an about 2000nt long 3'-UTR, was established.

On the base of this sequence the microRNAs 193-3p and 92a-2-5p were bioinformatically identified as potential regulators of MUC5AC. Using realtime-PCR and luciferase-reporter-assays, a suppression of MUC5AC could consistently be observed for both tested microRNAs. However, only one of them, the miRNA 193-3p, is expressed in lung epithelial cells as found in the examination of microRNA expression levels via Taqman-assay.

Collectively these findings implicate that the miRNA 193-3p directly downregulates MUC5AC expression in A549 cells. Although further studies are necessary, to evaluate the relevance *in vivo*, these studies offer a new approach for future pharmaceutical strategies attenuating the mucin secretion in the treatment of ARDS.

8 Literaturverzeichnis

1. Ashbaugh, D.G., et al., *Acute respiratory distress in adults*. Lancet, 1967. **2**(7511): p. 319-23.
2. Ferguson, N.D., et al., *The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material*. Intensive Care Med, 2012. **38**(10): p. 1573-82.
3. Dembinski, R. and F. Mielck, [ARDS - An Update - Part 1: Epidemiology, Pathophysiology and Diagnosis]. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2018. **53**(2): p. 102-111.
4. Force, A.D.T., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. JAMA, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
5. Thompson, B.T., R.C. Chambers, and K.D. Liu, *Acute Respiratory Distress Syndrome*. N Engl J Med, 2017. **377**(19): p. 1904-1905.
6. Bellani, G., et al., *Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 788-800.
7. Bernard, G.R., et al., *The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **149**(3 Pt 1): p. 818-24.
8. Pham, T. and G.D. Rubenfeld, *Fifty Years of Research in ARDS. The Epidemiology of Acute Respiratory Distress Syndrome. A 50th Birthday Review*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. **195**(7): p. 860-870.
9. Irish Critical Care Trials, G., *Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in Ireland: a prospective audit of epidemiology and management*. Crit Care, 2008. **12**(1): p. R30.
10. Li, G., et al., *Eight-year trend of acute respiratory distress syndrome: a population-based study in Olmsted County, Minnesota*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(1): p. 59-66.
11. Sakr, Y., et al., *High tidal volume and positive fluid balance are associated with worse outcome in acute lung injury*. Chest, 2005. **128**(5): p. 3098-108.
12. Rubenfeld, G.D., et al., *Incidence and outcomes of acute lung injury*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1685-93.
13. Nolan, S., et al., *Acute respiratory distress syndrome in a community hospital ICU*. Intensive Care Med, 1997. **23**(5): p. 530-8.
14. Sigurdsson, M.I., et al., *Acute respiratory distress syndrome: nationwide changes in incidence, treatment and mortality over 23 years*. Acta Anaesthesiol Scand, 2013. **57**(1): p. 37-45.
15. Luhr, O.R., et al., *Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(6): p. 1849-61.
16. Blank, R. and L.M. Napolitano, *Epidemiology of ARDS and ALI*. Crit Care Clin, 2011. **27**(3): p. 439-58.
17. Lewandowski, K. and M. Lewandowski, *Epidemiology of ARDS*. Minerva Anestesiol, 2006. **72**(6): p. 473-7.

18. Hudson, L.D. and K.P. Steinberg, *Epidemiology of acute lung injury and ARDS*. Chest, 1999. **116**(1 Suppl): p. 74S-82S.
19. Dembinski, R. and F. Mielck, [ARDS - An Update - Part 2: Therapy and Outcome]. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2018. **53**(2): p. 112-125.
20. Cheung, A.M., et al., *Two-year outcomes, health care use, and costs of survivors of acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(5): p. 538-44.
21. Oeyen, S.G., et al., *Quality of life after intensive care: a systematic review of the literature*. Crit Care Med, 2010. **38**(12): p. 2386-400.
22. Heyland, D.K., D. Groll, and M. Caeser, *Survivors of acute respiratory distress syndrome: relationship between pulmonary dysfunction and long-term health-related quality of life*. Crit Care Med, 2005. **33**(7): p. 1549-56.
23. Hill, A.D., et al., *Long-term outcomes and healthcare utilization following critical illness--a population-based study*. Crit Care, 2016. **20**: p. 76.
24. Kamdar, B.B., et al., *Joblessness and Lost Earnings after Acute Respiratory Distress Syndrome in a 1-Year National Multicenter Study*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. **196**(8): p. 1012-1020.
25. Herridge, M.S., et al., *Recovery and outcomes after the acute respiratory distress syndrome (ARDS) in patients and their family caregivers*. Intensive Care Med, 2016. **42**(5): p. 725-738.
26. Millar, F.R., et al., *The pulmonary endothelium in acute respiratory distress syndrome: insights and therapeutic opportunities*. Thorax, 2016. **71**(5): p. 462-73.
27. Castillo, R.L., R. Carrasco Loza, and C. Romero-Dapueto, *Pathophysiological Approaches of Acute Respiratory Distress syndrome: Novel Bases for Study of Lung Injury*. Open Respir Med J, 2015. **9**: p. 83-91.
28. Martin, T.R., *Neutrophils and lung injury: getting it right*. J Clin Invest, 2002. **110**(11): p. 1603-5.
29. Belperio, J.A., et al., *Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury*. J Clin Invest, 2002. **110**(11): p. 1703-16.
30. Reutershan, J., et al., *Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 695-702.
31. Deja, M., et al., [Epidemiology and Pathophysiology of the acute respiratory distress syndrome (ARDS)]. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2008. **43**(11-12): p. 758-66; quiz 768.
32. Koeppen, M., et al., *Detrimental role of the airway mucin Muc5ac during ventilator-induced lung injury*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(4): p. 762-75.
33. Fahy, J.V. and B.F. Dickey, *Airway mucus function and dysfunction*. N Engl J Med, 2010. **363**(23): p. 2233-47.
34. Thornton, D.J., K. Rousseau, and M.A. McGuckin, *Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 459-86.
35. Zen, Y., et al., *Lipopolysaccharide induces overexpression of MUC2 and MUC5AC in cultured biliary epithelial cells: possible key phenomenon of hepatolithiasis*. Am J Pathol, 2002. **161**(4): p. 1475-84.
36. Fujisawa, T., et al., *Regulation of airway MUC5AC expression by IL-1beta and IL-17A; the NF-kappaB paradigm*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6236-43.
37. Shao, M.X. and J.A. Nadel, *Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive*

- oxygen species, and TNF-alpha-converting enzyme.* J Immunol, 2005. **175**(6): p. 4009-16.
38. Shao, M.X., I.F. Ueki, and J.A. Nadel, *Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11618-23.
 39. Koeppen, M., T. Eckle, and H.K. Eltzschig, *Pressure controlled ventilation to induce acute lung injury in mice.* J Vis Exp, 2011(51).
 40. Song, W.Y., et al., *Tilianin inhibits MUC5AC expression mediated via down-regulation of EGFR-MEK-ERK-Sp1 signaling pathway in NCI-H292 human airway cells.* J Microbiol Biotechnol, 2016.
 41. Lee, H.J., et al., *Luteolin inhibited the gene expression, production and secretion of MUC5AC mucin via regulation of nuclear factor kappa B signaling pathway in human airway epithelial cells.* Pulm Pharmacol Ther, 2015. **31**: p. 117-22.
 42. Lee, S.U., et al., *Verproside inhibits TNF-alpha-induced MUC5AC expression through suppression of the TNF-alpha/NF-kappaB pathway in human airway epithelial cells.* Cytokine, 2016. **77**: p. 168-75.
 43. Sikder, M.A., et al., *Inhibition of TNF-alpha-induced MUC5AC mucin gene expression and production by wogonin through the inactivation of NF-kappaB signaling in airway epithelial cells.* Phytother Res, 2014. **28**(1): p. 62-8.
 44. Ryu, J., et al., *Effect of Prunetin on TNF-alpha-Induced MUC5AC Mucin Gene Expression, Production, Degradation of IkappaB and Translocation of NF-kappaB p65 in Human Airway Epithelial Cells.* Tuberc Respir Dis (Seoul), 2013. **75**(5): p. 205-9.
 45. Yang, D., et al., *Peroxiredoxin 6 suppresses Muc5ac overproduction in LPS-induced airway inflammation through H2O2-EGFR-MAPK signaling pathway.* Respir Physiol Neurobiol, 2017. **236**: p. 84-90.
 46. Song, K.S., et al., *Regulator of G-protein signaling 4 suppresses LPS-induced MUC5AC overproduction in the airway.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **41**(1): p. 40-9.
 47. Reutershan, J., et al., *Therapeutic anti-inflammatory effects of myeloid cell adenosine receptor A2a stimulation in lipopolysaccharide-induced lung injury.* J Immunol, 2007. **179**(2): p. 1254-63.
 48. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.* Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
 49. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans.* Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
 50. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.* Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
 51. Belter, A., et al., *Mature miRNAs form secondary structure, which suggests their function beyond RISC.* PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113848.
 52. Kreth, S., M. Hubner, and L.C. Hinske, *MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine.* Anesth Analg, 2018. **126**(2): p. 670-681.
 53. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.* Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
 54. Hock, J. and G. Meister, *The Argonaute protein family.* Genome Biol, 2008. **9**(2): p. 210.
 55. Ameres, S.L., J. Martinez, and R. Schroeder, *Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC.* Cell, 2007. **130**(1): p. 101-12.

56. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
57. Krol, J., et al., *Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 42230-9.
58. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.
59. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-16.
60. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
61. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2056-60.
62. Robb, G.B. and T.M. Rana, *RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading*. Mol Cell, 2007. **26**(4): p. 523-37.
63. Rivas, F.V., et al., *Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(4): p. 340-9.
64. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
65. Dykxhoorn, D.M., C.D. Novina, and P.A. Sharp, *Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 457-67.
66. Carmell, M.A., et al., *The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis*. Genes Dev, 2002. **16**(21): p. 2733-42.
67. Tasena, H., et al., *microRNA-mRNA regulatory networks underlying chronic mucus hypersecretion in COPD*. Eur Respir J, 2018. **52**(3).
68. Cheng, Z., et al., *MicroRNA-145 down-regulates mucin 5AC to alleviate airway remodeling and targets EGFR to inhibit cytokine expression*. Oncotarget, 2017. **8**(28): p. 46312-46325.
69. O'Leary, L., et al., *Airway smooth muscle inflammation is regulated by microRNA-145 in COPD*. FEBS Lett, 2016. **590**(9): p. 1324-34.
70. Zhong, T., et al., *MiR-146a negatively regulates neutrophil elastase-induced MUC5AC secretion from 16HBE human bronchial epithelial cells*. Mol Cell Biochem, 2011. **358**(1-2): p. 249-55.
71. Soroosh, A., et al., *Functional role and therapeutic targeting of microRNAs in inflammatory bowel disease*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2018. **314**(2): p. G256-G262.
72. Hydbring, P., et al., *Cell-Cycle-Targeting MicroRNAs as Therapeutic Tools against Refractory Cancers*. Cancer Cell, 2017. **31**(4): p. 576-590 e8.
73. Su, Y., et al., *Therapeutic strategy with artificially-designed i-LncRNA targeting multiple oncogenic microRNAs exhibits effective antitumor activity in diffuse large B-cell lymphoma*. Oncotarget, 2016. **7**(31): p. 49143-49155.
74. Tutar, L., et al., *Therapeutic Targeting of microRNAs in Cancer: Future Perspectives*. Drug Dev Res, 2015. **76**(7): p. 382-8.
75. Luck, M.E., S.A. Muljo, and C.B. Collins, *Prospects for Therapeutic Targeting of MicroRNAs in Human Immunological Diseases*. J Immunol, 2015. **194**(11): p. 5047-52.

76. Garg, M., *Targeting microRNAs in epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem cells: therapeutic approaches in cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2015. **19**(2): p. 285-97.
77. Tong, L., Y. Yuan, and S. Wu, *Therapeutic microRNAs targeting the NF-kappa B signaling circuits of cancers*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **81**: p. 1-15.
78. Taylor, M.A. and W.P. Schiemann, *Therapeutic Opportunities for Targeting microRNAs in Cancer*. Mol Cell Ther, 2014. **2**(30): p. 1-13.
79. Li, Z. and T.M. Rana, *Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(8): p. 622-38.

9 Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
AECC	Amerikanisch-europäische Konsensuskonferenz
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
Bp	Basenpaar
CPAP	Continuous positive airway pressure
E. coli	Escherichia coli
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion
Fluc/hluc+	Firefly-Luciferase
miRNA	microRNA
mRNA	Messenger-RNA
Nt	Nukleotid
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PaO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
RLM-RACE	RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends
Rluc	Renilla-Luciferase
TRALI	Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der miRNA-Biosynthese, Zielerkennung und Genregulation	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung des psiCHECK-2 Reporterkonstrukts	23
Abbildung 3: Relative mRNA-Expression von MUC5AC und Dicer in A549-Zellen.....	26
Abbildung 4: Schematische Darstellung der unterschiedlichen mRNA-Sequenzen für MUC5AC in den Gen-Datenbanken Anfang 2013	27
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Sequenzierungsprimer	28
Abbildung 6: Gelelektrophorese nach PCR der intergenetischen Region	29
Abbildung 7: Schematische Darstellung der angenommenen MUC5AC-Struktur nach Sequenzierung des intergenetischen Abschnittes zwischen MUC5AC und MUC5AC-like ...	29
Abbildung 8: Schematische Darstellung der ermittelten MUC5AC-Struktur.	30
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Primer zur Amplifikation und ggf. Sequenzierung der 3'UTR.....	31
Abbildung 10: Relative MUC5AC-mRNA-Expression nach miRNA-Transfektion	32
Abbildung 11: Luciferase-Aktivität nach Co-Transfektion der miRNAs	33

11 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Dr. Simone Kreth für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die sehr engagierte persönliche und fachliche Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Michael Koeppen für die wissenschaftliche Betreuung.

Bei Herrn Professor Zwißler möchte ich mich recht herzlich für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in der Klinik für Anaesthesiologie durchzuführen.

Auch möchte ich mich bei allen Laborkollegen für die freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit im Labor bedanken.

Mein größter Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Stefanie Schütz und Frau Dr. rer. nat. Elisabeth Limbeck für die fortwährende methodische und thematische Unterstützung. Ihre Anregungen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein Dank gilt auch Frau Gaby Gröger, Jessica Rink und Samra Alijagic für ihre großartige Hilfe bei praktischen und theoretischen Fragen.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, Sylvia Berg-Antón und Juan Antón, meinen Schwestern Sofía und Xenia Antón und meinen Freunden, die mich während meiner Studiums- und Doktorarbeitszeit begleitet und mir den Rücken gestärkt haben.