Charakterisierung von miRNAs als Modulatoren des TLR4-abhängigen MAPK Signalwegs

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Rebecca De Santis

aus Bremen

Berichter: apl. Prof. Dr. rer. nat. Dirk H. Ostareck

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Michael Huber

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ralph Panstruga

Tag der mündlichen Prüfung: 2. September 2016

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Inhalt

Zusammenfassung....1
Summary....2
1 Einleitung....3
1.1 Das Immunsystem und die inflammatorische Reaktion....3
1.1.1 Die Zellen des Immunsystems....3
1.1.2 Makrophagen....5
1.1.3 Der TLR4 Signalweg....6
1.1.4 SIRS und Sepsis....9
1.2 Die post-transkriptionale Regulation der Genexpression während der inflammatorischen Reaktion....10
1.3 Nicht-kodierende RNAs....11
1.3.1 Nicht-kodierende RNAs in Prokaryoten....11
1.3.2 Nicht-kodierende RNAs in Eukaryoten....12
1.4 MikroRNAs....13
1.4.1 MiRNA Biogenese....13
1.4.2 Regulationsmechanismen durch miRNAs....15
1.4.3 Die Regulation der Genexpression durch miRNAs während der Immunantwort....17
1.4.4 Die Funktion der miR-155 während der Immunantwort....17
1.5 Zirkulierende miRNAs und ihre Sekretion....18
1.6 Apoptose....19
1.7 Zielstellung....22
2 Material und Methoden....23
2.1 Chemikalien und Geräte....23
2.2 Zellkultur....25
2.2.1 Kultivierung, LPS-Stimulation und Ernte von RAW 264.7 Zellen....25
2.2.2 Kultivierung, LPS-Stimulation und Ernte von primären Makrophagen....25
2.2.3 Präparation von Tritonlysaten....26
2.2.4 Präparation von zytoplasmatischen, translationskompetenten Extrakten....27
2.2.5 Transfektion von RAW 264.7 Zellen mit antagomirs....27
2.2.6 Transfektion von RAW 264.7 Zellen mit Transkripten und miRNA *mimics*....28
2.2.7 Staurosporin-Behandlung von RAW 264.7 Zellen....28
2.2.8 Isolation von Exosomen aus RAW 264.7 Zellen....28
2.3 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren....29
2.3.1 Oligonukleotide und Plasmide....29
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)....30
2.3.3 Ortsspezifische Mutagenese....31

2.3.4 Restriktionsverdau 32
2.3.5 Gelelution 32
2.3.6 Ligation 32
2.3.7 Transformation von Bakterien 33
2.3.8 Plasmide 33
2.3.9 Präparation von Plasmiden 33
2.3.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 33
2.3.11 Agarose-Gelelektrophorese 33
2.4 Präparation und Analyse von RNA 34
2.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen 34
2.4.2 Präparation von miRNAs aus humanem Serum 35
2.4.3 DNase Verdau 35
2.4.4 Phenol-Chloroform Extraktion 35
2.4.5 Reverse Transkription von mRNAs 36
2.4.6 Reverse Transkription von miRNAs 36
2.4.7 Semi-quantitative PCR 36
2.4.8 Quantitative PCR 38
2.5 Northern Blot Analysen 40
2.5.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden 40
2.5.2 Polyacrylamidgelelektrophorese und Transfer der RNA 40
2.5.3 Kovalente Bindung und Hybridisierung von miRNA Sonden 41
2.6 *In vitro* Transkription 43
2.7 *In vitro* Translation 43
2.8 Bestimmung von RNA-Stabilitäten 44
2.9 Analyse von Proteinen 44
2.9.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford 44
2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 45
2.9.3 Silberfärbung von SDS-Gelen 45
2.9.4 Western Blot 46
2.10 Ago2 Immunopräzipitation 47
2.11 Caspase-3 Aktivitätsmessung 48
2.12 Durchflusszytometrie 48
2.13 Statistische Auswertungen 49
3 Ergebnisse 50
3.1 Die LPS-induzierte Aktivierung von Makrophagen 50
3.2 Identifizierung von differentiell regulierten miRNAs in Makrophagen 51

3.3 Validierung von differentiell regulierten miRNAs während der LPS-Antwort 53
3.4 CASPASE-3 mRNA als potentielle miR-155 Ziel-mRNA.....57
3.4.1 Untersuchungen zur LPS-Antwort in primären Makrophagen 58
3.4.2 MiR-155 und CASP-3 mRNA binden an den funktionalen miRISC.....60
3.4.3 Die CASP-3 mRNA Expression ist in LPS-aktivierten Makrophagen reduziert.....61
3.4.4 Nach Transfektion von antagomir-155 sind die CASP-3 mRNA Expression und der CASP-3 Proteingehalt erhöht.....63
3.4.5 Die Transfektion eines miR-155 *mimics* inhibiert die Translation der CASP-3 mRNA *in vivo*.....65
3.4.6 MiR-155 destabilisiert die CASP-3 mRNA in LPS-aktivierten Makrophagen 66
3.4.7 Analyse der anti-apoptotischen Funktion der LPS-induzierten miR-155 in Makrophagen.....70
3.5 Isolierung von zirkulierenden miRNAs aus humanem Serum.....79
3.6 Isolierung von Exosomen aus LPS-aktivierten Makrophagen 81
4 Diskussion und Ausblick 84
4.1 Zur Identifizierung differentiell regulierter miRNAs in LPS-aktivierten Makrophagen.....85
4.2 Zur Destabilisierung der CASP-3 mRNA durch die miR-155 86
4.3 Zur translationalen Inhibierung der IKKε mRNA durch die miR-155.....90
4.4 Zum Modell der miRNA-vermittelten Regulation der Genexpression.....91
4.5 Zur Apoptosekontrolle während der Immunantwort 92
4.5.1 Zur Funktion der miR-155 in der Kontrolle der Apoptose.....93
4.6 Ausblick 95
4.7 Zur Isolierung von zirkulierenden miRNAs in humanem Serum 96
4.7.1 Ausblick 97
4.8 Zur Sekretion von miRNAs in Mikrovesikeln 98
4.8.1 Ausblick 99
5 Literatur 100
6 Anhang.....115
Abkürzungsverzeichnis.....115
Klonierungsstrategien 118
Inkubationsbedingungen der Antikörper.....119
Relative Sequenzierhäufigkeit ausgewählter miRNA Kandidaten 120
Publikationsliste 123
Danksagung.....125

Zusammenfassung

Während der angeborenen und adaptiven Immunantwort zur Abwehr des Wirts gegen eindringende Pathogene, spielen aktivierte Makrophagen eine bedeutende Rolle. Die Bindung von Lipopolysacchhariden (LPS) an den *toll-like* Rezeptor 4 (TLR4) löst intrazelluläre Signalkaskaden aus, die in der Aktivierung von NF-κB und der Ausschüttung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen sowie der Induktion anti-apoptotischer Gene resultieren. Da sich aus einer fortdauernden Immunantwort schwere Krankheiten entwickeln können, ist eine strikte Kontrolle der inflammatorischen Antwort notwendig. Die Expression von TLR4-Signalweg Komponenten wird auf transkriptionaler und post-transkriptionaler Ebene reguliert. Ziel dieser Arbeit war es, post-transkriptionale Mechanismen aufzuklären, mit denen mikroRNAs (miRNAs) die Translation und/oder die Stabilität ihrer Ziel-mRNAs in LPS-aktivierten Maus-Makrophagen regulieren.

Mit dem Ziel differentiell exprimierte miRNAs zu identifizieren, wurden cDNA-Bibliotheken aus unbehandelten und LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen mittels Hochdurchsatzsequenzierung analysiert. Im Fokus dieser Arbeit stand dabei die miRNA-155 (miR-155), deren Expression durch LPS stark induziert ist. Northern Blot- und qPCR-Experimente bestätigten die signifikante Induktion der miR-155. Die Nutzung der Datenbank TargetScan™ identifizierte die CASPASE-3 (CASP-3) mRNA, welche für eine apoptotische Protease kodiert, als potentielle Ziel-mRNA der miR-155. In LPS-aktivierten primären Maus-Makrophagen wurden die TLR4-abhängige Expression von miR-155 und die Abnahme der CASP-3 mRNA gezeigt. Der endogene Proteingehalt von CASP-3 und gespaltener CASP-3 nahm in LPS-behandelten Makrophagen ab. Die Akkumulation der miR-155 und CASP-3 mRNA in funktionale miRNA-*induced silencing* Komplexe (miRISC) wurde mittels Argonaute (Ago2) Immunopräzipitation gezeigt. Die Transfektion eines antagomirs gegen die reife miRNA ergab eine effektive Inhibierung der miR-155, woraus eine signifikante Zunahme der CASP-3 mRNA resultierte. *In vitro* Translationsassays verdeutlichten, dass die miR-155 Bindestelle in der CASP-3 mRNA 3'UTR für die miR-155-abhängige Destabilisierung der CASP-3 mRNA verantwortlich ist. Die Annexin V Färbung von antagomir-155 transfizierten RAW 264.7 Zellen, welche zunächst mit LPS-aktiviert und dann mit Staurosporin (SSP) behandelt wurden, deutete darauf hin, dass die LPS-induzierte miR-155 die Apoptose von RAW 264.7 Zellen durch die Destabilisierung der CASP-3 mRNA verhindert. Dies scheint dazu beizutragen, dass die Makrophagen ihre wichtige Funktion innerhalb der Immunantwort aufrechterhalten können.

Die IKKε mRNA kodiert für eine wichtige TLR4-Signalweg Komponente und wurde in der Literatur als miR-155 Ziel-mRNA beschrieben. Allerdings konnte bisher der Mechanismus, welcher der miR-155-vermittelten Inhibierung der IKKε mRNA zugrunde liegt, nicht aufgeklärt werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu der CASP-3 mRNA die IKKε mRNA durch die LPS-induzierte miR-155 translational inhibiert wird.

Summary

To secure the functionality of activated macrophages in the innate immune response, efficient life span control is required. Recognition of bacterial lipopolysaccharides (LPS) by toll-like receptor 4 (TLR4) induces downstream signaling pathways, which merge to induce the expression of cytokine genes and anti-apoptotic genes. The expression of the kinases and their modulators involved in these pathways is regulated both at the transcriptional and post-transcriptional level. The aim of this work was to elucidate molecular mechanisms by which microRNAs (miRNAs) regulate target mRNA translation and stability in an inflammation-dependent manner.

In order to identify differentially expressed miRNAs, cDNA libraries generated from untreated or LPS-activated murine macrophages (RAW 264.7) were analyzed by deep sequencing. This study focused on miRNA-155 (miR-155) that is highly induced by LPS. Northern blot and qPCR experiments confirmed the significant induction of miR-155 expression, which was detected in the cloning analysis. Employing TargetScan^{TM}, CASPASE-3 (CASP-3) mRNA encoding a key player in apoptosis was identified as potential target of LPS-induced miR-155. LPS-dependent activation of primary murine macrophages revealed TLR4-mediated enhancement of miR-155 expression and CASP-3 mRNA reduction. Endogenous CASP-3 and cleaved CASP-3 protein declined in LPS-activated macrophages. In order to prove a functional relation between miR-155 and CASP-3 mRNA Argonaute 2 (Ago2) immunoprecipitation was performed. Co-precipitation of miR-155 and CASP-3 mRNA demonstrated their accumulation in miRNA-induced silencing complexes (miRISC). Remarkably, specific antagomir transfection effectively reduced mature miR-155 and resulted in significantly elevated CASP-3 mRNA levels in activated macrophages. *In vitro* translation assays demonstrated that the target site in the CASP-3 mRNA 3'UTR mediates miR-155-dependent Luciferase reporter mRNA destabilization. Annexin V staining of macrophages transfected with antagomir-155 and stimulated with LPS prior to staurosporine (SSP) treatment implied that LPS-induced miR-155 prevents apoptosis through CASP-3 mRNA down-regulation.

In conclusion, this work revealed that miR-155-mediated CASP-3 mRNA destabilization in LPS-activated RAW 264.7 macrophages suppresses apoptosis, as a prerequisite to maintain their crucial function in the inflammatory response.

IKKε represents an important protein of the TLR4 signaling pathway and the corresponding mRNA was published as a miR-155 target. However, ectopic miRNA-155 overexpression or inhibition did not clearly elucidate the mechanism underlying miR-155 mediated IKKε repression. This work showed that in contrast to CASP-3 mRNA, IKKε mRNA is rather translationally inhibited by LPS-induced miR-155 than destabilized.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem und die inflammatorische Reaktion

Der Körper reagiert auf eine Infektion durch Pathogene mit einer komplexen Entzündungsreaktion. Das wesentliche Ziel einer solchen inflammatorischen Antwort besteht darin, die Ausbreitung des Entzündungsreizes zu verhindern und eventuell entstandene Schäden zu reparieren.

Das Immunsystem der Säugetiere umfasst zwei Formen, die angeborene und die adaptive (erworbene) Immunität (Janeway 1989). Die angeborene Immunität stellt die erste Schutzbarriere des Körpers gegen eine sich entwickelnde Infektion dar. Sie sorgt für eine schnelle, inflammatorische Reaktion auf eindringende Krankheitserreger und hemmt eine sich ausbreitende Entzündung. Die Zellen, die an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind, umfassen Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Murphy et al. 2012). Auf ihrer Oberfläche tragen Immunzellen Rezeptoren (*pattern-recognition receptors,* PRRs) mit denen sie in der Lage sind, direkt auf schädliche Mikroorganismen zu reagieren. Diese PRRs erkennen konservierte, pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), wie z.B. Zellwandkomponenten von Bakterien und Pilzen oder virale Nukleinsäuren (Janeway und Medzhitov 2002; Akira et al. 2006). Das adaptive Immunsystem ist hingegen für die Eliminierung der Pathogene in der späten Phase der Infektion sowie für die Ausbildung eines „immunologischen Gedächtnisses" verantwortlich. Zu den Zellen, welche eine adaptive Immunantwort bewirken, zählen unter anderem die Antigen-spezifischen B- und T-Lymphozyten (bzw. B- und T-Zellen) (Murphy et al. 2012; Iwasaki und Medzhitov 2015).

1.1.1 Die Zellen des Immunsystems

Immunzellen stammen von einer pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark ab, die sich ihrerseits in zwei Stammzellformen teilt, die myeloide und die lymphoide Vorläuferzelle (Murphy et al. 2012) (s. Abbildung 1.1).

Die myeloide Stammzelle ist der Vorläufer der myeloiden Linie, welche Thrombozyten, Erythrozyten und die Granulozyten des angeborenen Immunsystems einschließt. Über eine Reihe von Entwicklungsstadien differenzieren aus der Vorläuferzelle über Monoblasten und Pro-Monozyten schließlich Monozyten, die aus dem Knochenmark in den peripheren Blutstrom entlassen werden (Gordon und Taylor 2005). Diese zirkulieren im Blut und können in die verschiedensten Gewebe einwandern, um sich dort zu Makrophagen und dendritischen Zellen

(DCs) zu entwickeln (Ziegler-Heitbrock 2000). Makrophagen zeichnen sich durch ihre hohe phagozytotische und intrazellulär proteolytische Aktivität aus und sezernieren im aktivierten Zustand inflammatorische Zytokine (s. Abschnitt 1.1.2). Dendritische Zellen haben ebenfalls phagozytotische Eigenschaften und aktivieren darüber hinaus durch die Antigenpräsentation auf ihrer Oberfläche die T-Lymphozyten der adaptiven Immunantwort (Tacke 2009). Neben Makrophagen, die durch die Ausschüttung von Zytokinen ebenfalls T-Lymphozyten aktivieren können, bilden DCs daher eine wichtige Verbindung zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Im Gegensatz zu Makrophagen, die hauptsächlich im Gewebe verbleiben, können reife DCs in die Lymphknoten wandern, wo die Interaktion und Induktion der T-Zellen erfolgt (Randolph et al. 1999; Lanzavecchia und Sallusto 2001). Granulozyten, die sich aufgrund spezifischer Nachweismethoden in neutrophile, basophile und eosinophile einteilen lassen, werden während der Immunantwort vermehrt produziert. Sie verlassen den Blutkreislauf um an den Ort der Entzündung zu wandern. Den größten Teil der Granulozyten machen die phagozytotisch aktiven, neutrophilen Granulozyten aus. Basophile und eosinophile sind an allergischen Reaktionen und der Abwehr von Parasiten beteiligt (Borregaard und Cowland 1997; Wright et al. 2010; Harvima et al. 2014).

Mastzellen sind vorwiegend in abgrenzenden Geweben lokalisiert, wie z.B. der Haut oder der Schleimhaut des Darms und der Atemwege (Metz und Maurer 2007). Neben ihrer Funktion bei der Erkennung von eindringenden Bakterien, Viren und Parasiten, spielen sie bei allergischen Erkrankungen, wie z.B. allergischem Asthma und Heuschnupfen, eine Rolle (Galli et al. 2008; Huber 2013).

Aus der lymphoiden Vorläuferzelle im Knochenmark entstehen die Antigen-spezifischen Lymphozyten der adaptiven Immunantwort, die T-Lymphozyten und B-Lymphozyten sowie die NK-Zellen, die der angeborenen Immunantwort zugehörig sind (Kondo et al. 1997). Im Falle einer Infektion zirkulieren die Lymphozyten als inaktive (naive) Lymphozyten im Körper, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen, welches sie aktiviert. Durch die Bindung eines Antigens an den spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche einer B-Zelle, proliferiert diese und differenziert zu einer Plasmazelle. Diese produziert spezifische Antikörper, die eine sezernierte Form des B-Zell Rezeptors darstellen und somit die identische Antigen-Spezifität besitzen. T-Lymphozyten werden ebenfalls durch die Bindung eines bestimmten Antigens aktiviert und differenzieren daraufhin zu verschiedenen T-Zelltypen: die zytotoxischen T-Zellen, die vor allem Virus-infizierte Zellen eliminieren, die T-Helferzellen, welche durch die Sekretion von Zytokinen andere Immunzellen aktivieren können und die regulatorischen T-Zellen, die bei der Kontrolle der Immunantwort mitwirken (Murphy et al. 2012). NK-Zellen können durch die Ausschüttung von zytotoxischen

Granula Tumorzellen zerstören (Russell und Ley 2002) und bei der Beseitigung von Virus-infizierten Zellen helfen (Abdul-Careem et al. 2012). Durch die Zytokin-vermittelte Aktivierung wird die Migration der NK-Zellen in die betroffenen Gewebe induziert. Darüber hinaus sind sie selbst in der Lage Zytokine, wie Interferon (IFN)-γ, zu sezernieren (Mandal und Viswanathan 2015).

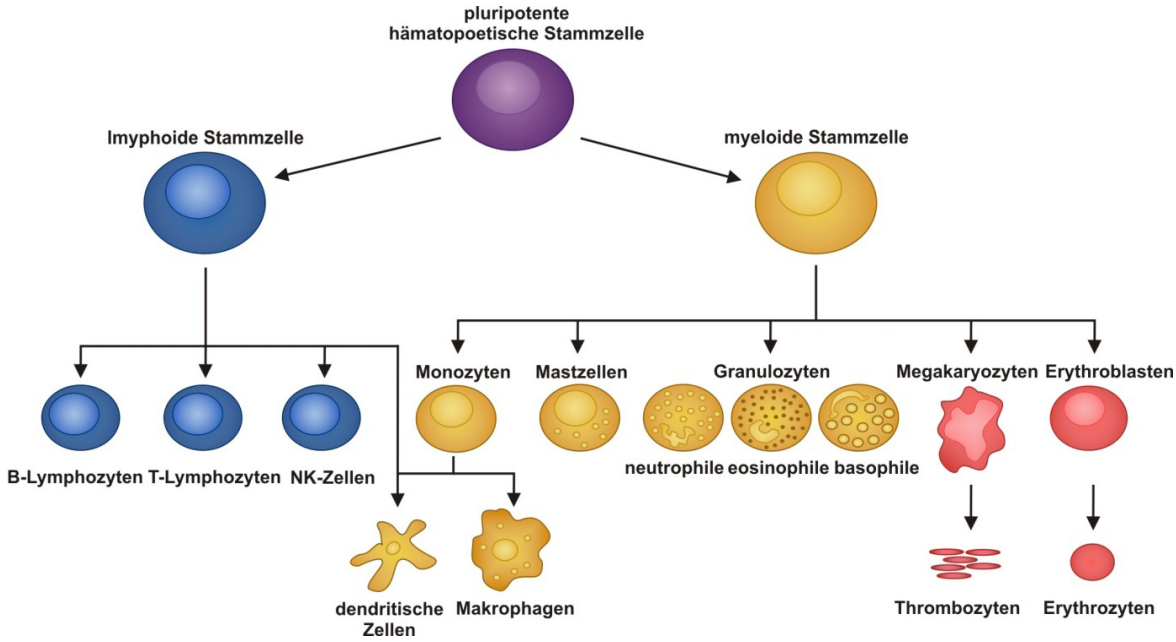

Abbildung 1.1 Vereinfachte Darstellung der Hämatopoese (Abbildung adaptiert nach (Murphy et al. 2012)). Die Zellen des Immunsystems stammen von einer pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark ab, die zu einer lymphoiden oder myeloiden Vorläuferzelle differenziert. Aus der lymphoiden Linie gehen die B- und T-Lymphozyten sowie die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) hervor. Auch eine Subpopulation von dendritischen Zellen in den Lymphknoten stammt von der lymphoiden Stammzelle ab. Die myeloide Stammzelle ist der Vorläufer von Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und dendritische Zellen sowie von Erythrozyten und Thrombozyten.

1.1.2 Makrophagen

Vor über 100 Jahren wurde Ilya Mechnikov für die Entdeckung der phagoyztotischen Eigenschaft von Makrophagen mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Seine Arbeiten begründeten die Anfänge der Immunologie als eigenständige Wissenschaft (Tauber 2003). Makrophagen sind in nahezu allen Geweben lokalisiert und spielen in einer Vielzahl von biologischen Prozessen eine wichtige Rolle (Laskin et al. 2001). In ihrer wesentlichen Funktion als Effektorzellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort, regulieren Makrophagen die Ausbreitung einer Infektion durch die Expression von spezifischen Oberflächenmarkern und der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen. Ferner sind Makrophagen auch an der Aufrechterhaltung der Homöostase durch Phagozytose von Zelltrümmern und apoptotischen Zellen sowie an der Nachbildung von verwundetem Gewebe beteiligt (Mosser und Edwards 2008). Makrophagen zeichnen sich durch

eine bemerkenswerte Plastizität aus, wodurch sie auf verschiedenste Umweltreize reagieren und daraufhin ihren Phänotyp anpassen können. Dieser Prozess wird als Polarisierung bezeichnet (Mosser und Edwards 2008; Wynn et al. 2013; Labonte et al. 2014). Eine funktionale Klassifizierung unterteilt Makrophagen in klassisch aktivierte (M1) und alternativ aktivierte (M2) Makrophagen (Martinez et al. 2009; Sica und Mantovani 2012). Der M1-Phänotyp wird durch mikrobielle Komponenten oder pro-inflammatorische Zytokine wie IFN-γ, TNF oder LPS aktiviert. Ferner sind M1-Makrophagen durch eine starke Zytokinsekretion (wie z.B. TNF-α, IL-6, IL-12 und IL-23) und durch die Produktion großer Mengen von Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoffspezies zur Potenzierung der Immunantwort charakterisiert. Dieser Phänotyp zeichnet sich ferner durch eine vermehrte Antigen-Präsentation (Induktion von T-Lymphozyten) und seine mikrobiozide und anti-tumorale Aktivität aus (Sica und Mantovani 2012; Wang et al. 2014). Makrophagen des M2-Phänotyps hingegen werden durch die Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 aktiviert. Sie wirken durch die Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-10, der sich ausbreitenden Immunantwort entgegen. Zudem sind M2-Makrophagen an der Bekämpfung von Parasiten sowie an der Wundheilung beteiligt. Sie sind durch eine effiziente, phagozytotische Aktivität und die Expression des Enzyms Arginase-1 charakterisiert, welches zum Aufbau der extrazellulären Matrix und damit zu der Reparatur von verwundetem Gewebe beiträgt (Mosser und Edwards 2008; Martinez et al. 2009; Labonte et al. 2014). Die Bezeichnung von Makrophagen als M1-und M2-Phänotyp wird jedoch unter dem Vorbehalt verwendet, dass diese in der Literatur beschriebenen Klassifizierungen kaum physiologisch vorkommen. Vielmehr repräsentieren die beiden Phänotypen zwei Enden eines Kontinuums mit überlappenden Funktionen (Mosser und Edwards 2008; Martinez und Gordon 2014; Malyshev und Malyshev 2015). So kommen z.B. Maus-Makrophagen mit sowohl M1- als auch M2-Markern in atherosklerotischen Plaques oder in Tumoren vor (Umemura et al. 2008; Kadl et al. 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass M2-Makrophagen dahingehend programmiert werden können, dass sie M1-spezifische Gene exprimieren (Labonte et al. 2014). Eine Weiterentwicklung der M1-/M2-Kennzeichnung wurde durch Transkriptomstudien humaner Makrophagen erreicht, welche mit verschiedensten Stimuli, darunter Zytokine, PRR-Liganden und Metaboliten, aktiviert wurden. In diesem sogenannten „Spektrum-Modell" wird beschrieben, dass die unterschiedlichen Stimuli mindestens neun verschiedenartige, transkriptionale Aktivierungsprogramme (Spektren) in den Makrophagen auslösen können (Xue et al. 2014).

1.1.3 Der TLR4 Signalweg

Die Aktivierung von Makrophagen durch PAMPs löst komplexe, intrazelluläre Signalkaskaden aus. Zu den PRRs gehört die Familie der *toll-like* Rezeptoren (TLRs), die während der angeborenen

Immunantwort eine essentielle Rolle spielt. TLRs zählen zu den Typ-1 Transmembranproteinen und besitzen eine extrazelluläre LRR (*leucin-rich repeat*) Domäne sowie eine konservierte, zytoplasmatische Toll/IL-1R Domäne. Die extrazelluläre Domäne ist in der Lage eine Reihe von mikrobiellen Liganden, wie z.B. Zellwandkomponenten von Bakterien oder Pilzen, bakterielle Flagelline sowie DNA und RNA Viren zu detektieren. Seit der Entdeckung des ersten TLR in *Drosophila* (Lemaitre et al. 1996) konnten durch genomweite Sequenzierungen bis heute 13 funktionale TLRs in Säugetiergenomen identifiziert werden (10 im Menschen und 12 in der Maus) (Nahid et al. 2011; Park und Lee 2013). Der *toll-like* Rezeptor 4 (TLR4) erkennt Lipopolysaccharide (LPS), welche den Hauptbestandteil der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien ausmachen (Shimazu et al. 1999; Alexander und Rietschel 2001). Die Interaktion von Makrophagen mit LPS ist ein komplexer Prozess, an dem das LPS-bindende Protein (LBP) und das an der Zelloberfläche von Makrophagen gebundene CD14 beteiligt sind. LPS wird zunächst aus den bakteriellen Membranen oder von dort abgeschnürten Vesikeln durch LBP aus dem Serum extrahiert. LBP transferiert LPS auf CD14, welches die LPS-Aggregate zu Monomeren auflöst und diese dem TLR4-MD-2 Heterodimer präsentiert (Park und Lee 2013). LPS interagiert mit der hydrophoben Tasche von MD-2 wodurch die Dimerisierung von zwei TLR4-MD-2 Komplexen induziert wird. Dies führt zur Rekrutierung von intrazellulären Adaptorproteinen, die über TIR-Domänen mit dem Rezeptor interagieren und zwei unterschiedliche Signalkaskaden auslösen können (s. Abbildung 1.2) (Park et al. 2009a). Die MyD88-abhängige LPS-Antwort induziert die frühe NF-κB Aktivierung an der die Adaptorproteine MyD88 und TIRAP beteiligt sind. Die Adaptorproteine TRAM und TRIF hingegen sind Teil der MyD88-unabhängigen, verzögerten LPS-Antwort (Takeda und Akira 2004). Ausgelöst durch die Bindung von LPS an TLR4 rekrutiert MyD88 die Kinase IRAK-1 durch die Interaktion der jeweiligen *death domain* der beiden Moleküle. IRAK-1 wird daraufhin durch IRAK-4 phosphoryliert und somit aktiviert (Li et al. 2002; Akira et al. 2006). TRAF6 wird durch die Stimulation zum Rezeptorkomplex rekrutiert und durch IRAK-1 über die Bindung an die TRAF Domäne aktiviert. Der IRAK-1/TRAF6 Komplex dissoziiert daraufhin von dem Rezeptor und bindet die Kinase TAK1 und die TAK1-bindenden Proteine TAB1 und TAB2. IRAK-1 verbleibt an der Membran und wird abgebaut, während der Komplex aus TRAF6, TAK1, TAB1 und TAB2 in das Zytoplasma wandert. Hier wird TRAF6 ubiquitiniert und TAK1 auf diese Weise aktiviert (Wang et al. 2001; Takeda und Akira 2004). Die Aktivierung der Kinase resultiert zum einen in der Phosphorylierung von MAP Kinasen, wie p38, JNK oder ERK 1/2, die den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren (Davis 1994; Raingeaud et al. 1996; Swantek et al. 1997). Zum anderen aktiviert TAK1 den IKK Komplex, der sich aus den Proteinen IKKα, IKKβ und IKKγ (auch als NEMO bekannt) zusammensetzt. Die Aktivierung des IKK Komplexes führt zur Phosphorylierung von IκB und damit zu dessen Abbau und der Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF-κB. Dieser kann nun in den

Nukleus translozieren und die Expression zahlreicher pro-und anti-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie z.B. TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-10, CXCL1 und CXCL2 sowie anti-apoptotischer Gene, wie z.B. ciap2, induzieren (Ulloa und Tracey 2005; Akira et al. 2006; Conte et al. 2006).

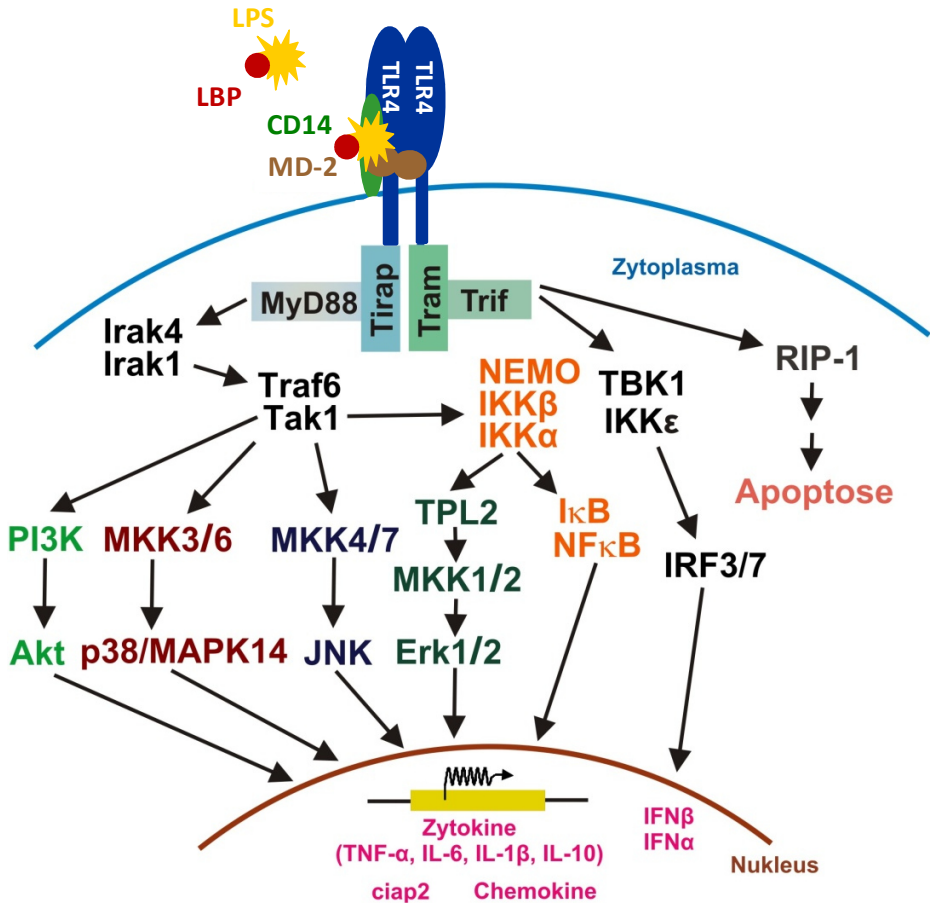

Abbildung 1.2 Der TLR4 Signalweg nach (Gaestel et al. 2009). Die Bindung von LPS (Lipopolysaccharide) an den *toll-like* Rezeptor 4 (TLR4) führt zu Initiierung von intrazellulären Signalkaskaden, die zur Ausschüttung von pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren sowie zur Expression von anti-apoptotischen Genen führt. LBP (LPS-*binding protein*), CD14 (*cluster of differentiation* 14), MD-2 (*lymphocyte antigen* 96), TLR4 (*toll-like receptor 4*), TIRAP (*toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein*), MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene* 88), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN*-β), IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*), TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), TAK1 (*transforming growth factor*-β *activated kinase 1*), NEMO (*inhibitor of κB kinase γ*), IKK (*inhibitor of κB kinase*), TBK1 (*TANK-binding kinase 1*), IκB (*inhibitor of NFκB*), NF-κB (*nuclear factor κB*), PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), Akt (*thymoma viral proto-oncogene*), MKK (*mitogen-activated protein kinase kinase*), p38 (*mitogen-activated protein kinase 14*), JNK (*c-Jun terminal kinase*), TPL2 (*tumor progression locus 2*) ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), IL (Interleukin), ciap2 (*cellular inhibitor of apoptosis 2*), IRF (*interferon regulatory factor*), IFN (*interferon*), RIP-1 (*receptor-interacting serine-threonine kinase 1*)

Der MyD88-unabhängige Signalweg führt zur Aktivierung von TBK1 und IKKε (s. Abbildung 1.2). Dies resultiert in der Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 und dadurch in der Expression von IFN-β und IFN-induzierbaren Genen (Shimada et al. 1999; Fitzgerald et al. 2003; Yamamoto et al. 2003a; Yamamoto et al. 2003b; Takeda und Akira 2004). Das

Adaptorprotein TRIF ist zudem in der Lage an RIP-1 zu binden (Han et al. 2004), welches wiederum über die *death domain* mit FADD (s. Abschnitt 1.6) interagieren kann und somit eine Verbindung zur Initiierung apoptotischer Signalwege herstellt (s. Abbildung 1.2) (Ruckdeschel et al. 2004).

1.1.4 SIRS und Sepsis

Ausgelöst durch vielfältige Faktoren wie Traumata, Verbrennungen, Pankreatitis oder Operationen kann der Körper eine übermäßige, unkontrollierte Immunantwort entwickeln. Ein *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) wird diagnostiziert, wenn zwei der folgenden Symptome vorliegen: Hyperthermie oder Hypothermie, Tachykardie oder Tachypnoe, Leukozytose oder Leukozytopenie sowie 10 % oder mehr unreife Neutrophile im Differentialblutbild. Der zusätzliche Verdacht oder die Bestätigung einer Infektion definiert eine Sepsis (ACCP/SCCM 1992; Bone et al. 1992; Balk 2014). Im weiteren Krankheitsverlauf kann sich aus der Sepsis eine schwere Sepsis (Sepsis und Organsdysfunktion), sowie ein septischer Schock entwickeln (schwere Sepsis und Schocksymptomatik). In der anfänglichen Phase der Sepsis kommt es zu einer hyper-inflammtorischen Antwort, die durch die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen (*cytokine storm*) ausgelöst wird. Daraus entwickelt sich schnell die hypo-inflammatorische Phase, die auch als anti-inflammatorische oder immunsuppressive Phase bezeichnet wird. Die wenigsten Patienten versterben dabei an der unkontrollierten Immunantwort innerhalb der ersten Phase der Sepsis. Vielmehr versterben die Patienten während des hypo-inflammatorischen Zustandes, aufgrund der Unfähigkeit des Körpers die primäre Infektion zu überwinden und der Entwicklung einer zweiten Infektion (Hotchkiss et al. 2013). Während dieser Phase wird der Zelltod der Effektorzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems induziert. Autopsien von Patienten, die an einer Sepsis verstarben, offenbarten die umfangreiche Apoptose von B- und T-Zellen sowie von dendritischen Zellen und Monozyten (Hotchkiss et al. 2001; Hotchkiss und Nicholson 2006).

Die Inzidenz einer Sepsis auf den deutschen Intensivstationen beträgt 154.000 Fälle pro Jahr, wovon ca. 79.000 Patienten an einer Sepsis und etwa 75.000 Patienten an einer schweren Sepsis leiden (Brunkhorst 2006; Engel et al. 2007). Mit einer Mortalitätsrate von 48 % ist die Entwicklung einer Sepsis die häufigste Todesursache auf den Intensivstationen in Deutschland und die dritthäufigste Todesursache aller Patienten Deutschlands (Engel et al. 2007). In den USA beträgt die Inzidenz der schweren Sepsis etwa 750.000 Fälle pro Jahr mit dadurch verursachten 210.000 Todesfällen (Angus et al. 2001; Hotchkiss et al. 2013). Die in Deutschland anfallenden Kosten, die sich durch die intensivmedizinische Behandlung einer schweren Sepsis ergeben, belaufen sich auf

1,77 Milliarden Euro pro Jahr. Damit entfallen etwa 30 % der Gesamtkosten der Intensivmedizin auf die Sepsisbehandlung (Brunkhorst 2006). Das frühzeitige Erkennen und die damit verbundene Qualität einer Sepsis-Therapie sind entscheidend für die Überlebenschance des Patienten. Die Etablierung von zuverlässigen Biomarkern ist daher notwendig, um eine schnellere und differenziertere Diagnose und infolgedessen, eine sofortige Behandlung einer Sepsis sicherzustellen (Ma et al. 2013; Tacke et al. 2014). Im Klinikalltag werden die Parameter IL-6, Procalcitonin (PCT) und C-reaktives Protein (CRP) verwendet, wobei jedoch eine zuverlässige Abgrenzung zwischen SIRS und Sepsis nicht ausreichend gegeben ist (Uzzan et al. 2006; Sridharan und Chamberlain 2013; Henriquez-Camacho und Losa 2014). Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass mikroRNAs (miRNAs, miRs) sich als diagnostische Marker diverser Krankheiten, wie Krebs, Diabetes oder Alzheimer eignen (Chen et al. 2008; Cortez et al. 2011; Femminella et al. 2015). Durch die Analyse der Expressionsmuster spezifischer miRNAs im Serum und Plasma von septischen Patienten wurde das Potential zirkulierender miRNAs als Sepsis-Marker untersucht (s. Abschnitt 1.5) (Vasilescu et al. 2009; Wang et al. 2012b; Ma et al. 2013; Wu et al. 2013; Tacke et al. 2014).

1.2 Die post-transkriptionale Regulation der Genexpression während der inflammatorischen Reaktion

Um zu vermeiden, dass sich eine exzessive, inflammatorische Antwort zu einer Sepsis entwickelt oder zu chronischen Entzündungen, wie rheumatoide Arthritis und Arteriosklerose führt, ist es unerlässlich, dass die angeborene Immunantwort zum Schutz des Organismus gegen eindringende Pathogene einer strengen Kontrolle unterliegt (Tacke 2009; Carpenter et al. 2014; Tan und Kagan 2014).

Die Genexpression von Immunzellen wird auf transkriptionaler und post-transkriptionaler Ebene durch schnell greifende und flexible, regulatorische Mechanismen kontrolliert. Neben *trans*-agierenden Faktoren, wie RNA-bindenden Proteinen (RBPs) oder nicht-kodierenden RNAs (s. Abschnitt 1.4.3), welche die Translation und Stabilität einer mRNA beeinflussen, umfasst die post-transkriptionale Regulation auch die Expression von alternativen Spleißvarianten und alternative mRNA Polyadenylierung von Komponenten des TLR4 Signalwegs (Carpenter et al. 2014). In Maus-Makrophagen und humanen Monozyten beispielsweise, binden MD-2 Varianten, welche von alternativ gespleißten Transkripten translatiert wurden, zwar an den TLR4-Rezeptor, die Signalkaskade wird jedoch nicht ausgelöst und die LPS-induzierte Aktivierung somit inhibiert (Ohta et al. 2004; Gray et al. 2010).

Die Interaktion des RBPs Tristetraprolin (TTP) mit seinen Ziel-mRNAs ist ein weiteres Beispiel für die post-transkriptionale Regulation der Genexpression in aktivierten Makrophagen. TTP bindet an AU-reiche Elemente (AREs) innerhalb der 3'untranslatierten Region (3'UTR) seiner Ziel-mRNAs, woraufhin zytoplasmatische Deadenylasen rekrutiert werden, die zur Degradierung des poly(A) Schwanzes und somit zum sukzessiven Abbau des Transkripts führen. Die Aktivierung des p38 MAPK Signalwegs durch LPS führt zur Phosphorylierung von TTP durch die Kinase MK2. Dies erlaubt die Bindung von 14-3-3-Proteinen, wodurch die Rekrutierung der Deadenylasen behindert wird und die Stabilität der mRNA steigt (Tiedje et al. 2010; Clement et al. 2011). Die physiologische Relevanz von TTP wurde außerdem in TTP *knock out* Mäusen deutlich, in denen eine erhöhte Stabilität der TTP Ziel-mRNA TNF-α zur chronischen Entzündung führte (Carballo et al. 1998). Die Interaktion zwischen dem RBP hnRNP K (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) und der TAK1 mRNA stellt ein weiteres Beispiel für post-transkriptionale Kontrolle während der Immunantwort dar. Die Expression der Kinase TAK1, die eine zentrale Rolle im TLR4 Signalweg einnimmt (s. Abschnitt 1.1.3), wird in unstimulierten Makrophagen durch die Bindung von hnRNP K an die 3'UTR der TAK1 mRNA translational inhibiert. In Folge der LPS-vermittelten Aktivierung der Makrophagen wird diese Inhibierung aufgehoben, die TAK1 mRNA verstärkt translatiert und somit die inflammatorische Antwort gefördert (Liepelt et al. 2014).

1.3 Nicht-kodierende RNAs

Neben den seit langem bekannten RNA-Spezies *messenger* RNA (mRNA), *transfer* RNA (tRNA) und ribosomaler RNA (rRNA), hat eine neue Klasse von RNAs in allen drei Domänen des Lebens (Eukarya, Bacteria, Archaea) zunehmend an Bedeutung gewonnen (Bartel 2004; Dennis und Omer 2005; Gottesman und Storz 2011). Diese kleinen, nicht-kodierenden RNAs sind an der post-transkriptionalen Regulation vielseitiger, biologischer Prozesse beteiligt.

1.3.1 Nicht-kodierende RNAs in Prokaryoten

Lange bevor miRNAs in Eukaryoten zum ersten Mal beschrieben wurden, waren regulatorische RNAs in Prokaryoten bekannt. 1984 wurde die erste als sRNA (*small* RNA) bezeichnete RNA in *E. coli* entdeckt (Mizuno 1984). Prokaryotische sRNAs sind etwa 50-300 nt lang, weisen ausgeprägte Sekundärstrukturen auf und sind häufig in intergenischen Regionen lokalisiert. Die am besten charakterisierte Klasse der sRNAs in Bakterien sind die *antisense* RNAs, die *trans*- oder *cis*-kodiert mit ihrer jeweilige Ziel-mRNA hybridisieren können. *Trans*-kodierte sRNAs binden ihre Ziel-mRNAs durch unvollständige Hybridisierung in der Nähe der ribosomalen Bindestelle (RBS) und verhindern so die Initiation der Translation. *Cis*-kodierte sRNA sind auf dem gegenüberliegenden Strang ihres Zielgens lokalisiert und können durch die vollständig

komplementäre Bindung die Translation und/oder die Stabilität der mRNA beeinflussen (Storz et al. 2011). Auch in der Domäne der Archaea konnten in den letzten Jahren kleine, regulatorische RNAs identifiziert werden, wobei über ihre Funktion und molekularen Mechanismen bisher wenig bekannt ist (Jager et al. 2009; Babski et al. 2014). In Prokaryoten wurden zudem spRNAs (*small peptide* RNAs) beschrieben, bei denen es sich um bifunktionale sRNA handelt, die zusätzlich zu ihrer regulatorischen Funktion kleine offene Leserahmen (ORFs) in ihrer Sequenz tragen, die für kleine Peptide (≤ 30 Aminosäuren) kodieren (Storz et al. 2014; Prasse et al. 2015).

1.3.2 Nicht-kodierende RNAs in Eukaryoten

In Eukaryoten zählen zu den am häufigsten vorkommenden Klassen nicht-kodierender RNAs neben den in Abschnitt 1.4 detailliert beschriebenen miRNAs, die *small interfering* RNAs (siRNAs), die PIWI-*interacting* RNAS (piRNAs) und die *long non-coding* RNAs (lncRNAs), die sich in ihrer Biogenese und ihrer zellulären Funktion voneinander unterscheiden.

Für die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi), dem *Silencing* der Genexpression durch RNA-Moleküle, wurden Andrew Fire und Craig Mello 1998 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (Fire et al. 1998). Im Gegensatz zu den im Genom kodierten miRNAs, sind siRNAs häufig exogenen Ursprungs. SiRNAs sind kleine, doppelsträngige RNA-Moleküle, die durch die Prozessierung durch das Enzym Dicer, einer RNase des Typs III, von langen dsRNA Vorläufern als Antwort auf eine Virusinfektion oder durch das artifizielle Einbringen in den Organismus generiert werden. Der reife Strang interagiert dabei, ähnlich wie während der miRNA Biogenese (s. Abschnitt 1.4.1), mit einem Argonaute 2 (Ago2) Protein, während der andere Strang abgebaut wird. SiRNAs binden mit hoher Spezifität an vollständig komplementäre Sequenzbereiche ihrer Ziel-mRNA, während dagegen die Bindung von miRNAs an die jeweilige Ziel-mRNA keine vollständige Komplementarität erfordert (s. Abschnitt 1.4.2) und somit eine einzelne miRNA ein breiteres Regulationsspektrum besitzt (Siomi und Siomi 2009; Ha und Kim 2014).

Die Piwi-*interacting* RNAs (piRNAs) wurden zum ersten Mal in Mäusehoden beschrieben (Aravin et al. 2006). PiRNAs sind 24-30 nt lang und werden, anders als miRNAs und siRNAs, unabhängig von Typ III RNasen von einzelsträngigen Vorläufermolekülen generiert (Ishizu et al. 2012). Zum Ausüben ihrer wesentlichen Funktion, der Inhibierung von Transposons in den Zellen der Keimbahn, interagieren piRNAs mit einer Unterfamilie der Ago-Proteine, den PIWI-Proteinen (Ha und Kim 2014). Ferner gehören zu den nicht-kodierenden RNAs die lncRNAs (*long noncoding RNAs*), bei denen es sich um eine heterogene Gruppe von RNA-Transkripten mit einer Länge von mindestens 200 nt handelt. LncRNAs sind bei epigenetischen Prozessen, wie der genomischen Prägung oder der Regulation der Chromatinstruktur sowie am zellulären Transport, der

Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und der RNA Prozessierung von Bedeutung und im Falle ihrer Fehlregulation an diversen Krankheitsbildern, wie z.B. der Krebsentstehung, beteiligt (Mitra et al. 2012).

1.4 MikroRNAs

MiRNAs sind kleine (etwa 22 nt), endogene RNA-Moleküle, die in nahezu allen biologischen Prozessen, über Entzündungs- und Stoffwechselreaktionen, Zelldifferenzierung und -wachstum, bis hin zum programmierten Zelltod (Apoptose) als post-transkriptionale Regulatoren auftreten (Bartel 2009; Ameres und Zamore 2013). Seit 1993 mit lin-4 in *C. elegans* die erste miRNA beschrieben wurde (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993), ist die Anzahl der bekannten miRNAs durch die Entwicklung innovativer Sequenziertechnologien enorm angestiegen. Die aktuelle Version der miRNA-Datenbank miRBase (Version 21 von Juni 2014) verzeichnet 35.828 reife miRNAs in insgesamt 223 Spezies (Griffiths-Jones et al. 2008; Kozomara und Griffiths-Jones 2014). Mit Hilfe computergestützter Vorhersagen wurde deutlich, dass jede miRNA hunderte Ziel-mRNAs regulieren kann, so dass die Mehrheit der proteinkodierenden Gene unter der Kontrolle von miRNAs sein könnte. Schätzungen zufolge werden in Säugetieren ca. 60 % der proteinkodierenden Gene durch miRNAs kontrolliert (Friedman et al. 2009). Die biologische Relevanz wird zudem dadurch verdeutlicht, dass miRNAs und ihre Ziel-mRNAs evolutionär konserviert sind.

1.4.1 MiRNA Biogenese

Die Biogenese von miRNAs ist ein zweistufiger Prozess, welcher durch die beiden Typ III RNasen, Dicer und Drosha sowie deren Kofaktoren katalysiert wird. MiRNAs werden durch RNA Polymerase II von Introns proteinkodierender Gene oder von unabhängigen Genen transkribiert. Für einige virale miRNAs konnte außerdem gezeigt werden, dass diese durch RNA Polymerase III transkribiert werden (Pfeffer et al. 2005). Das Primärtranskript der miRNAs (pri-miRNA) ist typischerweise aus einem 33-35 bp großen Stamm, einer terminalen Schleife und einzelsträngigen RNA-Abschnitten am 5'- und 3'-Ende aufgebaut (s. Abbildung 1.3). Die pri-miRNA wird im Zellkern durch den Mikroprozessorkomplex Drosha-DGCR8 prozessiert, so dass miRNA-Vorläufermoleküle mit Haarnadelstruktur mit einer Größe von ca. 70 nt (pre-miRNAs) entstehen. Die Haarnadelstrukturen der pre-miRNAs werden durch das Transportprotein Exportin 5 erkannt und mit Hilfe von Ran-GTP in das Zytoplasma der Zelle transportiert. Nach der Translokation durch die Zellkernpore wird GTP hydrolysiert und die pre-miRNA freigegeben. Im Zytoplasma wird die pre-miRNA durch Dicer und das RNA-Bindeprotein TRBP weiter zu einem ca. 20 bp miRNA/miRNA* Duplex prozessiert. Die reife miRNA wird auf den *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) geladen, dessen Hauptkomponente ein Ago Protein ist, welches die miRNA bindet. Der andere

Strang des miRNA Duplex wird als miRNA* bezeichnet und während der Biogenese abgebaut. Es sind jedoch auch Fälle bekannt, in denen beide Stränge des Duplexes eine funktionale miRNA hervorbringen können (Bartel 2004). Die Nomenklatur miRNA-5p und miRNA-3p gibt Auskunft darüber, von welchem Stamm der pre-mRNA die jeweilige miRNA abstammt (Dueck et al. 2014). Zur Ausübung ihrer regulatorischen Funktion leitet die reife miRNA den gesamten miRISC zu den 3'UTRs ihrer Ziel-mRNAs (s. Abschnitt 1.4.2) (Winter et al. 2009; Krol et al. 2010; Meister 2013; Dueck und Meister 2014; Ha und Kim 2014).

Abgesehen von dem klassischen miRNA Syntheseweg machten Hochdurchsatzsequenzierungen von kleinen RNAs aus Drosha, DGCR8 oder Dicer *knock out* Zellen deutlich, dass es zusätzlich alternative miRNA Synthesewege gibt. Die Biogenese der erythropoetischen miR-451 z.B., umgeht den Dicer-Prozessierungsschritt und die pre-miR-451 wird stattdessen durch Ago2, das ebenfalls endonukleolytische Eigenschaften besitzt, prozessiert (Cheloufi et al. 2010; Cifuentes et al. 2010; Ha und Kim 2014).

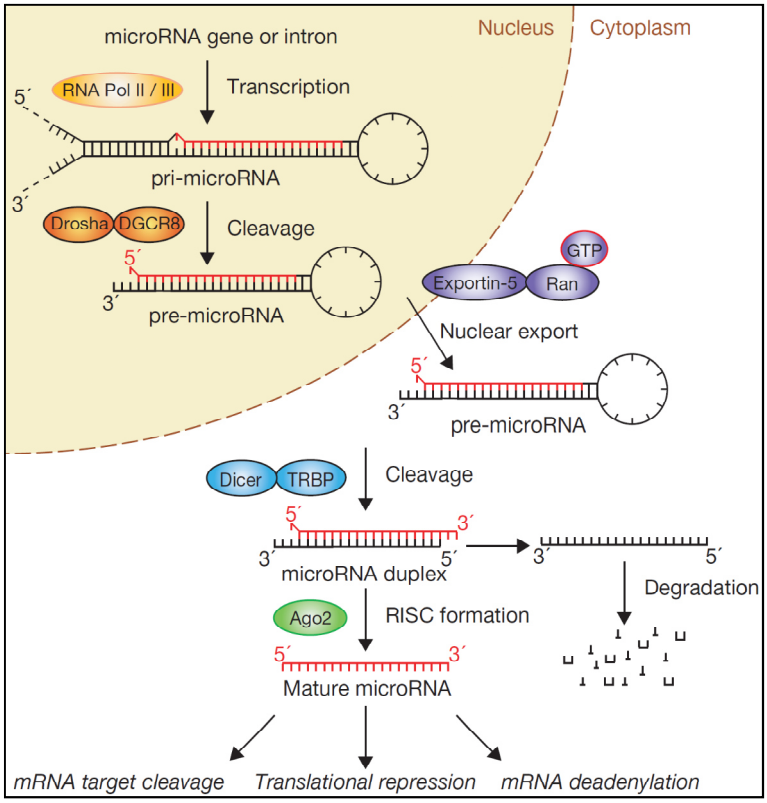

Abbildung 1.3 Die Biogenese von miRNAs nach (Winter et al. 2009). Durch RNA Polymerase II oder III werden pri-miRNAs im Zellkern transkribiert. Durch den Mikroprozessorkomplex Drosha-DGCR8 werden pri-miRNAs weiter zu pre-miRNAs prozessiert, die durch Exportin 5 in das Zytoplasma transportiert werden. Dicer spaltet die pre-miRNA zu einem miRNA Duplex von etwa 22 nt. Die reife miRNA wird auf den miRISC geladen, dessen Hauptkomponente das Ago2 Protein ist. Der andere Strang wird daraufhin abgebaut. Die reife miRNA führt den miRISC zu den 3'UTRs ihrer jeweiligen Ziel-mRNAs, wo sie durch Bindung an ihre Zielsequenz die Inhibierung der Translation und oder den Abbau der mRNA vermittelt.

Aufgrund der großen Anzahl von proteinkodierenden Genen, die durch miRNAs post-transkriptional reguliert werden und der Tatsache, dass deregulierte miRNAs im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten stehen, ist eine strenge Kontrolle der miRNA Biogenese erforderlich. Dabei kann die Regulation auf verschiedenen Ebenen erfolgen: während der miRNA Transkription, der Prozessierung durch Drosha und Dicer oder der Assoziation mit Ago Proteinen (Ha und Kim 2014). Die miRNA Abundanz wird durch die prozessierende Aktivität des Drosha-DGCR8 Komplexes bestimmt, der sich über einen hochkonservierten Mechanismus selbst reguliert. DGCR8 kann Drosha durch Protein-Protein-Interaktionen stabilisieren, während Drosha die DGCR8 mRNA destabilisieren kann und somit eine ausgeglichene Aktivität des Mikroprozessorkomplexes gegeben ist (Han et al. 2009; Ha und Kim 2014). Auch Ago Proteine können durch zahlreiche Modifikationen reguliert werden. Als Folge von Virusinfektionen oder Stress können humane Ago Proteine ADP-ribosyliert werden, wodurch ihre inhibitorische Aktivität gehemmt wird (Leung et al. 2011). Studien haben dabei gezeigt, dass durch miRNAs besetzte Ago Proteine stabilisiert werden, während "freie" Ago Proteine instabil sind (Martinez und Gregory 2013).

1.4.2 Regulationsmechanismen durch miRNAs

Die reife miRNA bindet über die an ihrem 5'-Ende gelegene *seed* Sequenz an partiell komplementäre Sequenzbereiche, die in der 3'UTR der jeweiligen Ziel-mRNA lokalisiert sind. Innerhalb des miRISC ist die miRNA mit einem Mitglied der Ago Proteine assoziiert, welches in Säugern das Ago2 Protein ist. Aufgrund der unvollständigen Komplementarität der meisten tierischen miRNAs zu ihrer Ziel-mRNA, rekrutiert Ago2 weitere Faktoren, welche die miRNA-vermittelte post-transkriptionale Regulation der Genexpression unterstützen. Diese umfasst eine Kombination aus translationaler Inhibition, mRNA Deadenylierung, *Decapping* und 5' → 3' Abbau der mRNA (s. Abbildung 1.4) (Huntzinger und Izaurralde 2011; Fabian und Sonenberg 2012; Jonas und Izaurralde 2015).

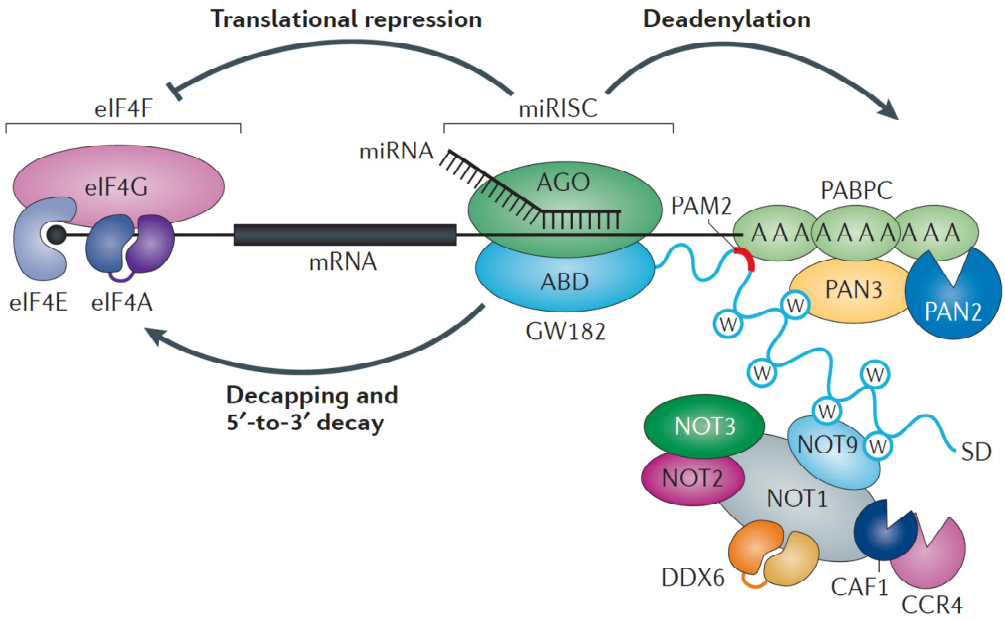

Abbildung 1.4 Übersicht des miRNA-vermittelten *gene-silencing* in Tieren nach (Jonas und Izaurralde 2015). MiRNAs, die an ein Ago Protein im miRISC gebunden sind, erkennen ihre Ziel-mRNA durch die Bindung an partiell komplementäre Bindestellen in der Ziel-mRNA 3'UTR. Das Ago Protein interagiert mit einem GW182 Protein, welches wiederum mit dem poly(A) Bindeprotein (PABPC) und den zytoplasmatischen Deadenylasen PAN2-PAN3 und CCR4-NOT interagiert, welche die Deadenylierung der mRNA katalysieren. Die 5' cap Struktur der deadenylierten mRNA wird durch das *Decapping* Enzym DCP2 entfernt und die mRNA daraufhin durch die 5' → 3'Exoribonuklease XRN1 abgebaut. Ferner ist die miRNA in der Lage, die Translation der Ziel-mRNA zu inhibieren. Dies erfolgt vermutlich auf Ebene der Translationsinitiation durch die Interaktion des miRISC mit dem eukaryotischen Initiationsfaktor 4F (eI4F)-Komplex.

Ago2 assoziiert direkt mit Proteinen der GW182 Familie, bei denen es sich um 182 kDa große Glycin-Tryptophan reiche Proteine handelt, die als *Scaffold*-Proteine fungieren. Diese interagieren sowohl mit dem poly(A)-Bindeprotein (PABPC), als auch mit den zytoplasmatischen Deadenylase-Komplexen PAN2-PAN3 und CCR4-NOT, was zum Abbau des mRNA poly(A) Schwanzes führt (Braun et al. 2013). Die 5' cap Struktur der deadenylierten mRNAs wird dann durch das *Decapping* Enzym DCP2 entfernt, wozu weitere Kofaktoren, u.a. DCP1, EDC3 und DDX6, notwendig sind (Jonas und Izaurralde 2013). Schließlich werden die deadenylierten mRNAs ohne 5' cap Struktur durch die zytoplasmatische 5' → 3' Exoribonuklease XRN1 abgebaut (Jonas und Izaurralde 2015). Der exakte Mechanismus der miRNA-vermittelten translationalen Inhibierung ihrer Ziel-mRNA ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass die Inhibierung während der Translationsinitiation erfolgt, durch die Beeinträchtigung der Aktivität oder Formierung des eukaryotischen Initiationsfaktor 4F (eIF4F) Komplexes (Jackson et al. 2010; Jonas und Izaurralde 2015).

1.4.3 Die Regulation der Genexpression durch miRNAs während der Immunantwort

Die Aktivierung des TLR4 Signalwegs durch LPS induziert neben vielen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren auch die Expression zahlreicher miRNAs, welche wesentlich an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind (Boldin und Baltimore 2012; O'Connell et al. 2012). Zu den ersten beschriebenen, inflammatorischen miRNAs gehören miR-146ab, miR-155 und miR-132, die in LPS-behandelten humanen Monozyten induziert werden (Taganov et al. 2006). MiR-146a wurde dabei als negativer *feedback*-Regulator der Immunantwort identifiziert. Die LPS-vermittelte Induktion von NF-κB (s. Abschnitt 1.1.3) führt zur vermehrten Expression des miR-146a Gens. Nach ihrer Transkription und Prozessierung inhibiert die miR-146a ihre Ziel-mRNAs, die für die TLR4 Signalwegkomponenten TRAF6 und IRAK1 kodieren und schwächt somit die LPS-Antwort ab (Taganov et al. 2006). Weitere zahlreiche inflammatorische miRNAs und Ziel-mRNAs wurden seitdem beschrieben. In peritonealen Maus-Makrophagen inhibieren miRNAs der let-7 Familie den TLR4 Rezeptor (Androulidaki et al. 2009). IKK-α ist Teil des IKK Komplexes (s. 1.1.3) und wird während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen durch miR-223 inhibiert, was zu einer verminderten NF-κB Aktivität führt (Li et al. 2010). In RAW 264.7 Zellen ist die Expression von miR-125b nach LPS-Stimulation verringert, wodurch ihre Ziel-mRNA, die für TNF-α kodiert, vermehrt translatiert wird (Tili et al. 2007).

1.4.4 Die Funktion der miR-155 während der Immunantwort

MiR-155 ist eine multifunktionale miRNA, die zusätzlich zu ihrer wichtigen Funktion während der Immunantwort, auch in chronisch inflammatorischen Krankheitsbildern, verschiedenen Krebsarten, während der Hämatopoese und bei der Apoptose eine Rolle spielt.

Neben humanen Monozyten konnte auch in Maus-Makrophagen und humanen dendritischen Zellen gezeigt werden, dass die Expression der miR-155 durch die Stimulation der Zellen mit LPS oder Zytokinen wie IFN-β und IFN-γ, stark induziert ist (Taganov et al. 2006; O'Connell et al. 2007; Ceppi et al. 2009; Dueck et al. 2014). In primären B-Lymphozyten, die mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) infiziert wurden, schwächt miR-155 die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB. Dies passiert womöglich, um die Immunantwort des Wirts zu unterdrücken und gleichzeitig das Virusgenom zu erhalten (Lu et al. 2008). Interessanterweise werden die reife miRNA und ihr Primärtranskript selbst durch NF-κB reguliert (Kluiver et al. 2005; Xiao et al. 2009; Ma et al. 2011). Es konnten bereits einige miR-155 Ziel-mRNAs identifiziert und validiert werden, die während der Entzündungsreaktion eine Funktion ausüben. Dazu gehören z.B. die wichtigen TLR4 Signalproteine TAB2 und IKKε, deren Inhibierung für eine verminderte Zytokinausschüttung sorgt und damit zu

einer Abschwächung der inflammatorischen Antwort (Tili et al. 2007; Lu et al. 2008; Ceppi et al. 2009). Auch in humanen Magenepithelzellen ist miR-155 durch die translationale Inhibierung des Adaptorproteins MyD88 an der *feedback*-Regulation der durch eine *Helicobacter plyori* Infektion ausgelösten Inflammationsreaktion beteiligt (Tang et al. 2010). Andererseits agiert die LPS-induzierte miR-155 auch pro-inflammatorisch und begünstigt in primären Makrophagen und dendritischen Zellen die Expression inflammatorischer Zytokine und die Interferon-Antwort. Dies geschieht durch die Inhibierung von Negativ-Regulatoren der Immunantwort wie SOCS1 (*suppressor of cytokine signaling 1*) und SHIP1 (*Inositol Polyphosphat-5-Phosphatase*) (Lu et al. 2009; O'Connell et al. 2010; Contreras und Rao 2012; O'Connell et al. 2012).

Die Effekte der miR-155 Expression haben auf zellulärer und Organismen-Ebene tiefgreifende Auswirkungen. Eine Fehlregulation oder eine veränderte Expression der miR-155 ist an einer Reihe von Krankheiten beteiligt. Eine erhöhte miR-155 Expression wurde in synovialen Fibroblasten und Geweben von Patienten mit rheumatoider Arthritis festgestellt (Stanczyk et al. 2008; Long et al. 2013). Außerdem ist miR-155 in akuter myeloischer Leukämie induziert und führt zu myeloischen Erkrankungen, wenn die miRNA im Knochenmark überexprimiert wird (O'Connell et al. 2008). Weiterhin fördert die erhöhte Expression der miR-155 durch die Inhibierung des an der NF-κB-Antwort beteiligten Transkriptionsfaktors BCL6 die Entwicklung von Arteriosklerose (Nazari-Jahantigh et al. 2012).

MiR-155 wird von dem Primärtranskript BIC (*B-cell integration cluster*) prozessiert, einem nicht-kodierenden Gen, dessen Sequenz in Mensch, Maus und Huhn hoch konserviert ist (Tam 2001; Faraoni et al. 2009). Sowohl BIC als auch miR-155 sind in einigen B-Zell Lymphomen stark induziert, wie z.B. im Hodgkin's Lymphom oder in EBV-induzierten Lymphomen (Kluiver et al. 2005; Lu et al. 2008). Aber auch in einigen Formen von Schilddrüsenkrebs (Braun und Huttelmaier 2011) und in Leber- und Prostatakarzinomen (Cai et al. 2015; Liu et al. 2015) ist die miR-155 Expression erhöht, weshalb miR-155 auch als *onco-miR* bezeichnet wird.

1.5 Zirkulierende miRNAs und ihre Sekretion

Kürzlich wurde gezeigt, dass miRNAs sehr stabil in vielen Körperflüssigkeiten, wie z.B. Serum, Plasma, Urin oder Speichel vorhanden sind (Mitchell et al. 2008; Park et al. 2009b; Hanke et al. 2010; Tacke et al. 2014). Zirkulierende (extrazelluläre) miRNAs zeigen dabei unter vielen pathologischen Bedingungen spezifisch veränderte Expressionsmuster, so dass sie sich als Biomarker für diverse Krankheiten eignen (Chen et al. 2012). Auch im Zusammenhang mit Sepsis wurden bereits einige miRNAs als potentielle Sepsismarker untersucht. So ist z.B. die Expression von miR-150 im Plasma und in den Leukozyten von septischen Patienten verringert (Vasilescu et

al. 2009), während in einer weiteren Studie gezeigt wurde, dass ein reduziertes miR-150 Level im Serum von kritisch kranken Patienten auf eine schlechte Genesung hinweist (Roderburg et al. 2013). Des Weiteren ist die Expression von miR-146a aus dem Serum septischer Patienten im Vergleich zu SIRS Patienten und gesunden Probanden deutlich reduziert (Wang et al. 2010).

Die Sekretion von zirkulierenden miRNAs ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, jedoch werden in der Literatur drei verschiedene Sekretionswege diskutiert: Erstens, das passive Austreten der miRNAs aus Zellen mit einer geringen Lebensdauer, wie z.B. Thrombozyten oder aus Zellen, die durch Gewebeschäden, Apoptose oder Nekrose zerstört wurden. Zweitens, die aktive Sekretion, durch extrazelluläre Vesikel, wie Exosomen oder Mikrovesikel (MV) sowie drittens, durch die Assoziation mit RNA-bindenden Proteinen, wie den Ago Proteinen des miRISC (s. Abschnitt 1.4.1) (Chen et al. 2012). Es wird dabei vermutet, dass die Stabilität der zirkulierenden miRNAs auf dem Schutz der Membranstrukturen der MV bzw. auf der Bindung mit RBPs beruht. Das Verpacken der miRNAs in MV scheint ein selektiver Prozess zu sein. In THP-1 Zellen werden als Antwort auf verschiedene Stimuli miRNAs spezifisch sezerniert und in das umgebene Medium abgegeben. Ferner konnte gezeigt werden, dass die in MV aus THP-1 Zellen (Donor-Zellen) enthaltene miR-150 in der Lage ist, in humanen Endothelzellen (Rezipienten-Zellen) spezifisch ihre Ziel-mRNA zu inhibieren (Zhang et al. 2010).

1.6 Apoptose

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist ein fundamentaler, evolutionär konservierter Prozess, in dem beschädigte Zellen beseitigt werden, um die Homöostase von Geweben aufrechtzuerhalten (Shalini et al. 2015). Eine fehlregulierte Apoptose kann zur Entstehung von malignen Tumoren, neurodegenerativen Störungen oder Autoimmunkrankheiten führen (Thompson 1995). Zu den Kennzeichen apoptotischer Zellen gehören die Chromatin-Kondensierung, die Fragmentierung der DNA, die Bildung von Membranbläschen sowie das Schrumpfen der Zellen und die Deassemblierung in Vesikel (Kerr et al. 1972). Apoptose wird durch zwei wesentliche Signalwege in der Zelle induziert, den intrinsischen und den extrinsischen Weg (s. Abbildung 1.5).

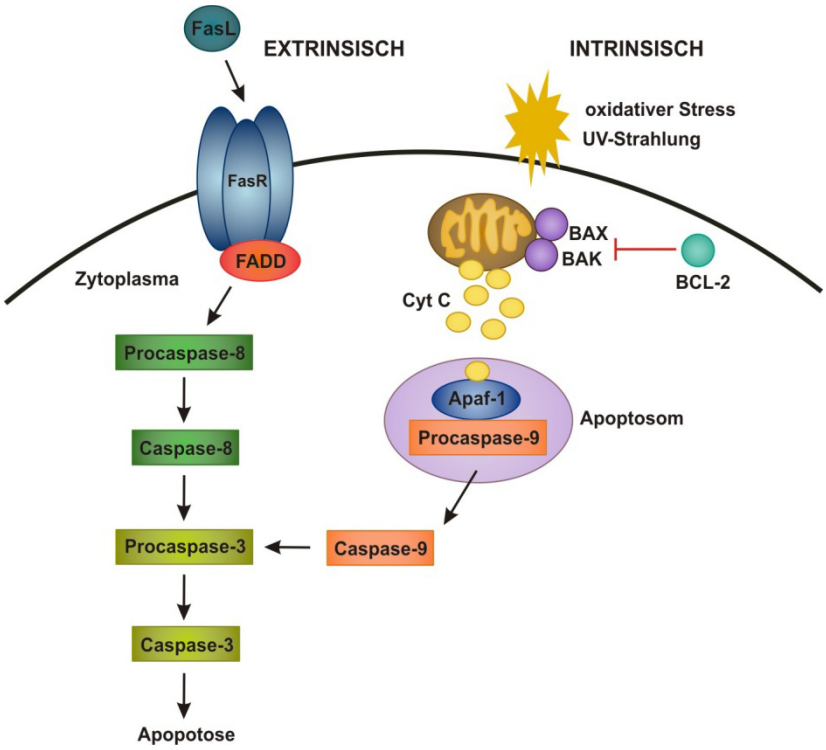

Abbildung 1.5 Vereinfachtes Schema der Signalwege die zur Apoptose der Zelle führen (verändert nach (Shalini et al. 2015). Der extrinsische Signalweg wird über *death receptors* der TNF Superfamilie vermittelt, die über spezifische Liganden aktiviert werden. Das Adaptorprotein FADD ist über die zytoplasmatischen *death domains* an den Rezeptor gebunden und kann so mit der Procaspase-8 interagieren. Durch autoproteolytische Spaltung wird Caspase-8 aktiviert und kann ihrerseits die Effektor-Caspase-3 prozessieren, die in ihrer aktiven Form Apoptose induziert. Der intrinsische Signalweg wird durch Hypoxie, DNA-Schäden oder oxidativen Stress initiiert. Durch die Aktivierung der pro-apoptotischen Effektor-Proteine BAX und BAK wird Cytochrom C (Cyt C) aus den Mitochondrien entlassen. Dies führt zur Oligomerisierung von sieben Apaf-1 Proteinen, welche jeweils eine Initiator-Caspase-9 und ein Cyt C Molekül binden und so einen großen Proteinkomplex, das Apoptosom, bilden. Nach Aktivierung der Procaspase-9 spaltet Caspase-9 die Procaspase-3.

Der intrinsische, oder mitochondriale Signalweg, wird durch Zellstress, wie UV-Strahlung, oxidativen Stress oder zytotoxische Medikamente ausgelöst und durch anti-apoptotische Proteine der BCL-2 Familie reguliert. Die Aktivierung von pro-apoptotischen Effektorproteinen (BAX, BAK) resultiert in der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und der Ausschüttung von Cytochrom C. Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) assoziiert mit Cytochrom C und bildet einen großen, multimeren Komplex, das Apoptosom, um die Initiator-Caspase-9 zu spalten und somit zu aktivieren. Die gespaltene Caspase-9 induziert ihrerseits die Prozessierung der Effektor-Caspase-3, die im aktivierten Zustand die Apoptose initiiert (Kluck et al. 1997; Czabotar et al. 2014; Shalini et al. 2015). Der extrinsische Signalweg wird durch sogenannte *death receptors* der TNF-Superfamilie, wie Fas, TNFR oder TRAIL vermittelt. Durch die Bindung des Liganden FasL an den Fas-Rezeptor (FasR) erfolgt die Assoziation von drei FasR-Molekülen. Über die zytoplasmatischen *death domains* des Rezeptors wird das Adaptorprotein FADD (*Fas-associated death domain protein*) gebunden. FADD interagiert über eine DED (*death effector domain)* mit der

Effektor-Caspase-8, die daraufhin gespalten wird und Caspase-3 aktiviert (Boldin et al. 1995; Ashkenazi und Dixit 1998; Kischkel et al. 2001).

Caspasen (*cysteine aspartic proteases*) sind proteolytische Enzyme, die funktional in apoptotische und inflammatorische Caspasen unterteilt werden. Zu den apoptotischen Caspasen gehören die Initiator-Caspasen (Caspase-8, -9, und 10) und die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7), während Caspase-1, -4, -5, -11 und -12 zu den inflammatorischen Caspasen gezählt werden (Shalini et al. 2015). Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Zymogene (Procaspasen) vor, die durch *up-stream* gelegene Initiator-Caspasen proteolytisch in zwei Untereinheiten gespalten werden. Die kleinere Untereinheit repräsentiert dabei die aktive Form. Die aktive Caspase-3 (CASP-3) erkennt ihre Substrate spezifisch über eine Peptidsequenz (Asp-x-x-Asp-G). Diese werden C-terminal vom Apartatrest (Asp) von CASP-3 gespalten und somit inaktiviert (Han et al. 1997; Porter und Janicke 1999).

Kürzlich veröffentlichte Studien zeigten, dass Caspasen wesentlich am Zusammenspiel von apoptotischen und inflammatorischen Signalwegen beteiligt sind (Creagh 2014). Apoptotische Caspasen sind ebenfalls in Inflammasomen zu finden, großen, zytoplasmatischen Proteinkomplexen die in Makrophagen und Neutrophilen zur Sezernierung des Zyokins IL-1β beitragen (Drenth und van der Meer 2006; Gurung et al. 2014). Umgekehrt sind inflammatorische Caspasen in der Lage, Apoptose zu induzieren (Miura et al. 1993).

1.7 Zielstellung

Makrophagen bilden einen Hauptbestandteil der angeborenen Immunantwort zur Abwehr des Wirts gegen eindringende Krankheitserreger. Mikrobielle Pathogene werden von den Makrophagen über TLRs wahrgenommen. Die Bindung von LPS an den TLR4 löst intrazelluläre Signalkaskaden aus, die zur Aktivierung von NF-κB und damit zur Ausschüttung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine sowie zur Expression anti-apoptotischer Gene führen. Die strikte Kontrolle der inflammatorischen Antwort ist von enormer Bedeutung, da eine exzessive und anhaltende Immunantwort zu Krankheiten wie Arthritis, Arteriosklerose sowie zu Sepsis oder Krebs führen kann. Die Expression von TRL4-Signalwegkomponenten wird sowohl auf transkriptionaler als auch auf post-transkriptionaler Ebene reguliert. Neben RNA-bindenden Proteinen bilden miRNAs wichtige post-transkriptionale Regulatoren der Immunantwort, da sie die translationale Inhibierung ihrer Ziel-mRNAs vermitteln und/oder deren Stabilität beeinflussen können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst differentiell exprimierte miRNAs in LPS-aktivierten Maus-Makrophagen identifiziert werden. Im nächsten Schritt wurden Kriterien erarbeitet, um die identifizierten miRNAs zu kategorisieren und mittels Northern Blot und qPCR Analyse erfolgte die Validierung der differentiellen Expression.

Für die miR-155, deren Expression 40-fach reguliert ist, wurden in weiteren Untersuchungen neue potentielle Ziel-mRNAs identifiziert. Da miR-155 eine multifunktionale miRNA ist, die in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen, wie z.B. während der Krebsentstehung oder der Hämatopoese eine wichtige Rolle einnimmt, sollten die molekularen Mechanismen der miR-155-vermittelten Regulation der inflammatorischen Genexpression in RAW 264.7 Zellen untersucht werden.

Makrophagen sind ein primärer Bestandteil der angeborenen Immunantwort. Zu ihren grundlegenden Aufgaben als Fresszellen gehört die Identifizierung und Entfernung von Apoptosekörperchen, Krebszellen und anderen Fremdkörpern durch Phagozytose. Durch die Ausschüttung von Zytokinen und die Präsentation von Antigenen an der Zelloberfläche von Makrophagen können weitere Immunzellen aktiviert werden. Da die Aufrechterhaltung der Funktion von aktivierten Makrophagen im Verlauf der angeborenen Immunantwort wichtig ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese untersucht werden, ob die LPS-induzierte miR-155 an der Kontrolle der Apoptose in aktivierten Makrophagen durch post-transkriptionale Regulationsmechanismen beteiligt ist.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Firma
1-Methylimidazol	Sigma-Aldrich
7-AAD	Sigma-Aldrich
Aceton	VWR
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Carl Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth
Agar	Carl Roth
Agarose	Invitrogen
Aminosäuren	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetat	Applichem
Ampicillin	Carl Roth
Annexin V-APC	BD Biosciences
APS	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Borsäure	Applichem
Bromphenolblau	Merck
BSA	NEB
BSA (Albumin Fraktion)	Applichem
Cap-Analogon	Kedar
Chloroform	Applichem
DilC16	Thermo Fisher Scientific
DMEM	Invitrogen
DMSO	Sigma-Aldrich
dNTPS	Fermentas
DTT	Gerbu
EDC	Sigma-Aldrich
EDTA (Titriplex III)	Merck
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Merck
FBS	Biochrom
Ficoll 4000	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Formamid	Applichem
Gel loading buffer II	life technologies
GelRed	Biotium
Glukose	Merck
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Glykogen	Roche
Guanidinumthiocyanat	Carl Roth

Chemikalien	**Firma**
Harnstoff	Applichem
HCl	Applichem
Hepes	Gerbu
Isopropanol	VWR
Kaliumacetat	Applichem
Kaliumchlorid	Applichem
KOH	Applichem
Kreatinkinase	Roche
Kreatinphosphat	Sigma-Aldrich
LB-Medium	Carl Roth
Leupeptin	Applichem
LPS (*E. coli*)	Sigma-Aldrich
LPS (*Salmonella minnesota*)	Forschungszentrum Borstel
Magnesiumacetat	Applichem
Magnesiumchlorid	Applichem
Methanol	VWR
Milchpulver	Sucofin
Na_2HPO_4	Applichem
Natriumacetat	Applichem
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich
Natriumcitrat	Applichem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Pepstatin	Applichem
PMSF	Carl Roth
Polyvinylpyrrolidon K30	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-frei)	Roche
Protein G-Agarose	Roche
Roti®-Aqua-Phenol	Carl Roth
Roti®-Block	Carl Roth
Roti®-Phenol	Carl Roth
Roti®-Quant	Carl Roth
RPMI-Medium	Invitrogen
Saccharose	Merck
Silbernitrat	Merck
TEMED	Applichem
Trichloressigsäure	Merck
Tris-Base	Merck
Triton X-100	Sigma-Aldrich
tRNA (bovine)	Sigma-Aldrich
Tween-20	Merck
Xylencyanol	ICN Biomedicals

Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Geräte

Geräte	Firma
Blot-Apparatur *semi-dry*	Biorad
GenePulser II	Biorad
ImageQuant LAS-4000	Fujifilm
Luminometer	Berthold Technologies
LSRFortessa	BD Biosciences
NanoDrop 2000	Peqlab
Nass-Blot-Apparatur	Biorad
StepOnePlus Real Time PCR System	life technologies
Ultrazentrifuge und SW40-Ti-Rotor	Beckmann Coulter

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung, LPS-Stimulation und Ernte von RAW 264.7 Zellen

Die murine RAW 264.7 Zelllinie geht aus Lymphomen hervor, die durch den *Abelson leukemia virus* induziert wurden (Raschke et al. 1978). Die Zellen (TIB-71, ATCC) wurden in DMEM, versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS, sowie 1 % Penicillin und Streptomycin, kultiviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen zunächst für eine Woche kultiviert, dann mit einer Dichte von 4×10^6 Zellen pro 15 cm-Platte ausgesät und nach zweitägiger Kultivierung verwendet bzw. passagiert. Zur Stimulation wurden 10 ng/ml LPS (*E. coli*, Serotyp 0111:B4) in das Kulturmedium gegeben und wenn nicht anders beschrieben für 6 h weiter kultiviert. Zur Ernte von Gesamt-RNA wurden die Zellen zunächst auf Eis mit kaltem 1 x PBS gewaschen und mit einem Kunststoffschaber in PBS von den Zellkulturplatten abgelöst. Die Zellen wurden in entsprechende Zentrifugenröhrchen überführt, für 5 min bei 4 °C und 300 g abzentrifugiert und erneut mit PBS gewaschen.

<u>10 x PBS</u>
1,37 M NaCl
26,8 mM KCl
100 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O
20 mM KH_2PO_4

2.2.2 Kultivierung, LPS-Stimulation und Ernte von primären Makrophagen

Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden L929 Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. S. Burgdorf, LIMES-Institut, Universität Bonn) mit einer Dichte von $1{,}5 \times 10^6$ Zellen pro 15 cm Platte in 30 ml RPMI-1640 Medium, versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS, sowie 1 % Penicillin und Streptomycin, kultiviert. Nach viertägiger

Kultivierung wurde der Überstand gesammelt, durch einen 0,22 µm Filter gefiltert und bei -20 °C gelagert (Weischenfeldt und Porse 2008). Zur Gewinnung von *bone marrow-derived macrophages* (BMDM) aus dem Knochenmark von Mäusen, wurden die Knochen (Femur, Tibia und Humerus) präpariert und die Knochenmarkszellen mit RPMI-1640 Medium, supplementiert mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS, 1 % Penicillin und Streptomycin, sowie 30 % konditioniertem Medium, gespült. Die Präparation der in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurde durch Dr. med. Jana Mossanen (Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care, UK Aachen) durchgeführt. Nach viertägiger Kultivierung und Ausdifferenzierung der Primärzellen wurden diese, je nach Zelldichte, im Verhältnis 1:2 oder 1:3 gesplittet und nach drei weiteren Tagen Kultivierung wurde das Experiment durchgeführt. Zur Aktivierung mit LPS wurden die BMDM mit 5 ng/ml gereinigtem LPS von *Salmonella minnesota* (Klaus Brandenburg, Forschungszentrum Borstel) stimuliert und wenn nicht anders beschrieben für 2 h kultiviert. Die Zellernte für die Präparation von Gesamt RNA erfolgte wie in 2.2.1 dargestellt, nur dass die BMDM mit einem Gummischaber in PBS von den Zellkulturplatten abgelöst wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wildtyp C57BL/6 Mäuse oder Mäuse mit einem TLR4-Rezeptor *knock out* ($TLR4^{-/-}$) verwendet. Letztere trugen einen zusätzlichen Hepatozyten-spezifischen NEMO *knock out* unter der Kontrolle eines Alb-*cre* Promotors (Hoshino et al. 1999). Die $TLR4^{-/-}$-Mäuse waren Alb-*cre* positiv und wurden freundlicherweise von Prof. C. Trautwein (Medizinische Klinik III, UK Aachen) zur Verfügung gestellt und durch Antje Mohs (Medizinische Klinik III, UK Aachen) genotypisiert.

2.2.3 Präparation von Tritonlysaten

RAW 264.7 Zellen wurden wir in 2.2.1 beschrieben geerntet und das Zellpellet in 80 µl Tritonlysepuffer resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C und 20.800 g zentrifugiert. Das Zelllysat wurde von den Zelltrümmern getrennt und bei -80 °C gelagert. Für die Detektion von phosphorylierten Proteinen im Western Blot wurden dem Tritonlysepuffer zusätzlich Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt. Für die Detektion von Markerproteinen aus Exosomen wurde 5 x Tritonlysepuffer verwendet.

1 x Tritonlysepuffer	Phosphatase-Inhibitoren
50 mM Tris, pH 7,4	37,3 mM p-Nitrophenylphosphat
300 mM NaCl	10 µM Natriumvandat
1 % (v/v) Triton X-100	10 mM Natriumfluorid
1 mM DTT	10 mM β-Glycerophosphat
1 mM PMSF	50 µM Natriummolybdat
1 µg/ml Leupeptin	
2 µg/ml Pepstatin	

2.2.4 Präparation von zytoplasmatischen, translationskompetenten Extrakten

Die Präparation von zytoplasmatischem Extrakt wurde durch hypotone Lyse in Anlehnung an das Protokoll von (Barton und Flanegan 1993) durchgeführt. Für die Präparation wurden 25-28 15 cm Platten verwendet. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben geerntet, jedoch nach dem Ablösen mit dem Zellschaber dreimal mit isotonem Puffer gewaschen. Der Puffer wurde vollständig vom Zellpellet entfernt, das Pellet gewogen und im gleichen Volumen (v/w) hypotonem Puffer vorsichtig resuspendiert. Zum Anschwellen der Zellen erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis und im Anschluss die Lyse der Zellen mit Hilfe eines Glas-Dounce-Homogenisators. Für die Präparation von zytoplasmatischem Extrakt nach Transfektion der RAW 264.7 Zellen, sowie nach der Behandlung mit Staurosporin, wurde eine 26 *gauge*-Kanüle verwendet. Durch Zentrifugation für 10 min bei 20.800 g und 4 °C wurden die Zelltrümmer und -kerne abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -150 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der Extrakte erfolgte wie in Abschnitt 2.3.10 beschrieben.

Isotoner Puffer	Hypotoner Puffer
35 mM HEPES/KOH pH 7,6	10 mM Hepes/KOH pH 7,6
146 mM NaCl	10 mM Kaliumacetat
11 mM Glukose	0,5 mM Magnesiumacetat
	5 mM DTT
	Protease-Inhibitor Cocktail (EDTA-frei)

Alle Puffer-Komponenten wurden sterilfiltriert und der isotone Puffer wurde kurz vor dem Zeitpunkt der Ernte frisch angesetzt.

2.2.5 Transfektion von RAW 264.7 Zellen mit antagomirs

1×10^6 RAW 264.7 Zellen wurden in DMEM ohne FBS und Antibiotika mit 160 pmol chemisch modifizierten *antisense* Oligonukleotiden (antagomirs) versetzt und bei 360 V und 500 µF für 6 msec transfiziert. Die antagomirs wurden nach (Krutzfeldt et al. 2005) entworfen, bestehend aus 2'O-methylierten RNA Basen und partiellen Phosphorothioatbindungen, um die Stabilität der antagomirs in den Zellen zu erhöhen. Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen für die RNA-Analyse auf einer 6-well Platte (1×10^6 Zellen pro well) und für die Präparation von zytoplasmatischem Extrakt auf einer 10 cm Platte (6×10^6 Zellen pro Platte) in DMEM mit Zusätzen (s. 2.2.1) ausgesät. Die Ernte erfolgte 48 h nach der Transfektion. Die Zellen wurden dabei 6 h vor der Ernte mit LPS stimuliert. Die Sequenzen der verwendeten antagomirs (Eurofins Genomics) sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Übersicht der verwendeten antagomirs

Antagomir	Sequenz
antagomir-155	[acCCCUAUCACAAUUAGCAuuaa]
antagomir-122	[caAACACCAUUGUCACACucca]

Die Großbuchstaben repräsentieren Phosphordiesterbasen, die Kleinbuchstaben Phosphorothioat-Bindungen zwischen den Basen und die eckigen Klammern kennzeichnen 2'-O-Methyl-RNA Basen.

2.2.6 Transfektion von RAW 264.7 Zellen mit Transkripten und miRNA *mimics*

1 x 10^6 RAW 264.7 Zellen wurden nach den in 2.2.5 beschriebenen Bedingungen mit 1,25 pmol cap Firefly Luciferase Casp-3 (fLUC Casp-3), 0,125 pmol cap *Renilla* Luciferase (rLUC) sowie 100-fachem molaren Überschuss miR-155 mimic oder miR-122 mimic, welcher als Kontrolle diente, co-transfiziert. Die RAW 264.7 Zellen wurden 3 h nach Transfektion in 1 x Lysepuffer (Promgea) lysiert und die Luciferase Aktivität mit Hilfe des *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) gemessen. Die Sequenzen der verwendeten miRNA *mimics* (biomers.net) sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4 Übersicht der verwendeten miRNA *mimics*

Name	Strang	Sequenz
miR-155 mimic	5'	UUAAUGCUAAUUGUGAUAGGGGU
	3'	CUCCUACCUGUUAGCAUUAAC
miR-122 mimic	5'	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
	3'	AAACGCCAUUAUCACACUAA

2.2.7 Staurosporin-Behandlung von RAW 264.7 Zellen

Das Alkaloid Staurosporin (SSP) wurde ursprünglich aus *Streptomyces staurosporeus* isoliert und wird zur Induktion von Apoptose verwendet (Chae et al. 2000). Nach einer 30-minütigen Vorbehandlung der RAW 264.7 Zellen mit 10 ng/ml LPS wurden die Zellen für weitere 6 h mit 500 nM SSP inkubiert, das direkt in das Kulturmedium gegeben wurde. Für die Kombination der SSP-Behandlung mit der Transfektion der RAW 264.7 Zellen, wurde die antagomir-Transfektion 48 h vor der Zellernte wie in 2.2.5 beschrieben durchgeführt.

2.2.8 Isolation von Exosomen aus RAW 264.7 Zellen

Zur Isolierung von Exosomen aus RAW 264.7 Zellen wurde das Exo-spin™ Kit (Cell Guidance System) verwendet. Dafür wurden die Makrophagen zunächst 48 h vor der Durchführung des

Experiments wie in 2.2.1 beschrieben passagiert, mit der einzigen Änderung das Exosomen-freies FBS zur weiteren Kultivierung verwendet wurde. Das bereits hitzeinaktivierte FBS wurde zu diesem Zweck in einer Ultrazentrifuge (Optima L-80 XP) im Ausschwingrotor (SW40-Ti-Rotor) bei 120.000 g für 90 min bei 4 °C ohne Abbremsen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und sterilfiltriert.

Die RAW 264.7 wurden zunächst für 1 h bei 37 °C mit 50 µM Dil-C16 inkubiert, welches sich in die Zellmembranen einlagern kann, so dass abgeschnürte Exosomen detektiert werden können. Im Anschluss wurden die Makrophagen unbehandelt belassen oder wie in 2.2.1 beschrieben, mit 10 ng/ml LPS für 6 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium in entsprechende Zentrifugenröhrchen überführt und zunächst 10 min bei 500 g und 4 ° abzentrifugiert. Zur Überprüfung der LPS-Stimulation wurden die RAW 264.7 Zellen währenddessen von den Zellkulturplatten, wie in 2.2.1 erläutert, abgelöst, geerntet und für die Präparation von RNA mittels Trizol (s. 2.4.1) und die Herstellung von Tritonlysat (s. 2.2.3) verwendet.

Der Überstand des abzentrifugierten Mediums wurde durch Abkippen in frische Zentrifugenröhrchen überführt und daraufhin für 20 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in frische Zentrifugenröhrchen überführt und dann weiter nach Herstelleranweisungen des Exo-Spin™ Kits verfahren. Im abschließenden Schritt erfolgte dabei die Reinigung der Exosomen über Säulen. Das Eluat wurde zu einem Drittel für die RNA-Präparation mittels Trizol und zu zwei Drittel für die Herstellung von Tritonlysat verwendet.

2.3 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.3.1 Oligonukleotide und Plasmide

Die in dieser Arbeit genutzten Klonierungsprimer und Plasmide sind in Tabelle 5 bzw. Tabelle 6 aufgelistet. Fett markiert sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Pst1* und *Xho1*. Details zu den einzelnen Klonierungsstrategien sind im Anhang (s. Tabelle Anhang 1) erläutert.

Tabelle 5 Übersicht der verwendeten Klonierungsprimer

ID	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
TRAF6 3'UTR_Pst1	*sense*	GTG **CTG CAG** CTC AAT CGT TTA ATA AG
TRAF6 3'UTR_Xho1	*antisense*	GCA T**CT CGA G**CT AAA TCA CTC GTT TG
Casp3 3'UTR	*sense*	AT**C TGC AG**A AAG CTG TCA GGG
Casp3 3'UTR	*antisense*	GCG T**CT CGA G**TA GCT ATA ATG C
IKKε 3'UTR	*sense*	AC**C TGC AG**T TCT GGT TCC ATC
IKKε 3'UTR	*antisense*	GCT G**CT CGA G**AA TCC TCA AAG

Fett markiert sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Pst1* bzw. *Xho1*.

Tabelle 6 Übersicht der verwendeten und klonierten Plasmide

Bezeichnung	Quelle
pBSIIKS(+)-LUC	(Liepelt et al. 2014)
pBSIIKS(+)-LUC-Traf6 3'UTR mut1	diese Arbeit
pBSIIKS(+)-LUC-Traf6 3'UTR mut2	diese Arbeit
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)	(Liepelt et al. 2014)
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-Traf6 3'UTR	diese Arbeit
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-Traf6 3'UTR mut1	diese Arbeit
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-Traf6 3'UTR mut2	diese Arbeit
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-Casp-3 3'UTR	(De Santis et al. 2016)
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-Casp-3 3'UTR mut	(De Santis et al. 2016)
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-IKKε 3'UTR	(De Santis et al. 2016)
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-IKKε 3'UTR mut	(De Santis et al. 2016)
pGEM CAT	(Stripecke und Hentze 1992)
pBSIIKS(+)-*Renilla*-poly(A)	(Thermann und Hentze 2007)

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen wurden PCR-Reaktionen mit cDNA aus unbehandelten RAW 264.7 Zellen als *template* und der *Pfu* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

50 µl PCR-Ansatz:

10 x *Pfu* Puffer (inkl. $MgSO_4$)	5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
10 µM *sense* Primer	1 µl
10 µM *antisense* Primer	1 µl
cDNA	1 µl
Pfu DNA Polymerase	1 µl
ddH_2O	ad 50 µl

Die Amplifikation erfolgte mit folgendem PCR-Programm:

95 °C	5 min	initiale Denaturierung
35 Zyklen:		
95 °C	30 sec	Denaturierung
57 °C	30 sec	Hybridisierung der Primer
72 °C	5 min	Elongation
72 °C	15 min	finale Elongation

Die Hybridisierungstemperatur der Primer liegt 5 °C unter der gemittelten Schmelztemperatur der Primer. Die Elongationszeit ergibt sich aus der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz. Die

Reinigung der PCR-Ansätze erfolgte mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) nach Angaben des Herstellers.

2.3.3 Ortsspezifische Mutagenese

Um spezifisch Nukleotide innerhalb einer DNA-Sequenz auszutauschen bzw. zu mutieren, wurde die ortsspezifische Mutagenese-PCR nach dem QuickChange Protokoll (Agilent Technologies) angewandt. Für diesen Zweck wurden Plasmide, welche das gewünschte Wildtyp DNA-Fragment enthielten, mit einer Konzentration von 50 ng/µl in die PCR eingesetzt. Die Primer wurden so konstruiert, dass die gewünschte Mutation etwa in der Mitte der Sequenz lag (s. Tabelle 7).

50 µl PCR Ansatz

10 x *Pfu* Puffer (inkl $MgSO_4$)	5 µl
10 mM dNTPs	2 µl
10 µM *sense* Primer	1 µl
10 µM *antisense* Primer	1 µl
Pfu DNA Polymerase (2 U/µl)	1 µl
template DNA (50 ng/µl)	1 µl
ddH_2O	ad 50 µl

Das dazugehörige PCR-Programm lautete wie folgt:

95 °C	1-3 min	
35 Zyklen:		
	95 °C	30 sec
	68-72 °C	1 min
	72 °C	10 min (2 min/kb)
72 °C	5 – 10 min	

Die Hybridisierungstemperatur der Primer liegt 5 °C unter der gemittelten Schmelztemperatur der Primer. Die Elongationszeit beträgt hier 2 min pro kb, wobei die hier verwendeten Plasmide eine durchschnittliche Länge von 5 kb hatten. Im Anschluss an die PCR wurde der Ansatz mit 1 µl *Dpn1* versetzt, um die methylierten, parentalen Plasmidstränge abzubauen, welche nicht die gewünschte Mutation trugen. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und daraufhin mittels Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt (s. 2.4.4). Das erhaltene DNA-Pellet wurde in 10 µl ddH_2O aufgenommen und der gesamte Ansatz in *E. coli* XL-1 blue transformiert (s. 2.3.7). Mittels Sequenzierung durch Eurofins Genomics wurde der Erfolg der ortsspezifischen PCR-Mutagenese überprüft. Es wurden dafür der T3-Primer von Eurofins Genomics oder für die Plasmide mit poly(A) Schwanz der LUC DICE MS2 Primer (5’ CCTCATAAAGGCCAAGAAGG 3’) verwendet.

Tabelle 7 Übersicht der verwendeten Primer für die ortsspezifische Mutagenese

ID	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
TRAF6 mut1	sense	GTTACCGCTCTGGTGTTGAG**aaga**CATTTAGTTGACTCCTGTG
	antisense	CACAGGAGTCAACTAAATG**tctt**CTCAACACCAGAGCGGTAAC
TRAF6 mut2	sense	GATCCCTGGAAGGCTTAAG**aaga**CAAGTACTCCCTCCTCTATAG
	antisense	CTATAGAGGAGGGAGTACTTG**tctt**CTTAAGCCTTCCAGGGATC
CASP-3 mut	sense	CAAAGTTGCCCTTTTATAATT**tcgt**AGATTTGGCGATACTATG
	antisense	CATAGTATCGCCAAATCT**acga**AATTATAAAAGGGCAACTTTG
IKKε mut	sense	CCATTGGCCAACAAACTA**cgta**TACTTTGACTGTCCTCTTGGG
	antisense	CCCAAGAGGACAGTCAAAGTA**tacg**TAGTTTGTTGGCCAATGG

Fett markiert sind die substituierten Basen.

2.3.4 Restriktionsverdau

Das sequenzspezifische Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen für die Klonierung und Überprüfung von Plasmiden, sowie zur Linearisierung von Plasmiden für die *in vitro* Transkription, erfolgte in Kombination mit den vom Hersteller (NEB) als 10-fache Stammlösungen mitgelieferten Puffersystemen. Die Spaltungsreaktionen erfolgten nach den Empfehlungen des Herstellers. Die Reinigung der Restriktionsverdaue erfolgte durch das *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche), das *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben, oder durch Phenol-Chloroform Extraktion.

2.3.5 Gelelution

Für die Extraktion von aufgetrennten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) verwendet. Das gewünschte GelRed-gefärbte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell herausgeschnitten und die DNA nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

2.3.6 Ligation

Die Ligation von linearisierter Plasmid-DNA mit restriktionsverdauten DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4 DNA Ligase (NEB). Die Reaktionen erfolgten 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C, dabei wurde das zu ligierende DNA-Fragment im Überschuss (1:5) eingesetzt. Eine Re-Ligation des linearisierten Vektors wurde durch vorherige Dephosphorylierung des 5' Phosphats mittels alkalischer Phosphatase (Roche) verhindert.

2.3.7 Transformation von Bakterien

Zur Transformation wurden die chemokompetenten Bakterien (*E .coli* XL1 blue) mit der Plasmid-DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C und eine erneute Inkubation für 2 min auf Eis. Die Bakterien wurden mit 300 µl LB-Medium versetzt und für 30 min bei 37 °C geschüttelt. Nach dem Ausplattieren auf Ampicillin-haltigem Agar wurden die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.3.8 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 6 aufgelistet.

2.3.9 Präparation von Plasmiden

Zur Isolierung von Plasmiden aus Mini- bzw. Midikulturen wurde das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit (peqlab) oder das Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet. Die Präparation erfolgte nach Angaben der Hersteller. Zur Kontrolle der klonierten Plasmide wurden diese zunächst durch Restriktionsverdau überprüft und im Anschluss durch Eurofins Genomics sequenziert um Mutationen auszuschließen (Primer s. 2.3.3).

2.3.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm an einem Spektralphotometer (NanoDrop) bestimmt, wobei eine optische Dichte von 1 einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl bzw. einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl entspricht. Zudem wurde so die Qualität der DNA- bzw. RNA-Probe überprüft und mögliche Kontaminationen durch Proteine oder Phenolreste ausgeschlossen.

2.3.11 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte durch nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese. Durch Zugabe von GelRed (Biotium), einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA oder RNA interkaliert und durch UV-Licht angeregt werden kann, konnten die Nukleinsäuren mit dem ImageQuant LAS 4000-Gerät (Fujifilm) sichtbar gemacht werden. Für die Untersuchung von DNA wurde je nach zu erwartender Größe der DNA-Fragmente, 1-2 % Agarose in 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und 1:20.000 mit GelRed versetzt. Falls nötig wurde den Proben 4 x DNA-Ladepuffer beigefügt. Die Elektrophorese wurde bei 90 V durchgeführt. Für die Analyse von RNA wurde 1,5 % Agarose in frisch angesetztem 1 x TAE-Puffer gelöst und 1:10.000 GelRed hinzugefügt. Die RNA-Proben wurden mit dem gleichen Volumen RNA-Ladepuffer (*Gel loading Buffer* II, Ambion) versetzt, 4 min bei 90 °C denaturiert und nach 4-minütiger Inkubation auf Eis

bei 70 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Abschätzung der Größe der Nukleinsäuren wurden Größenstandards verwendet, die in Abbildung 2.1 dargestellt sind.

10 x TBE Puffer	50 x TAE-Puffer	4 x DNA-Ladepuffer
89 mM Tris	40 mM Tris	0,2 % (w/v) Bromphenolblau
89 mM Borsäure	20 mM Essigsäure	0,2 % (w/v) Xylencyanol
2 mM EDTA	1 mM EDTA	50 % (v/v) Glycerin

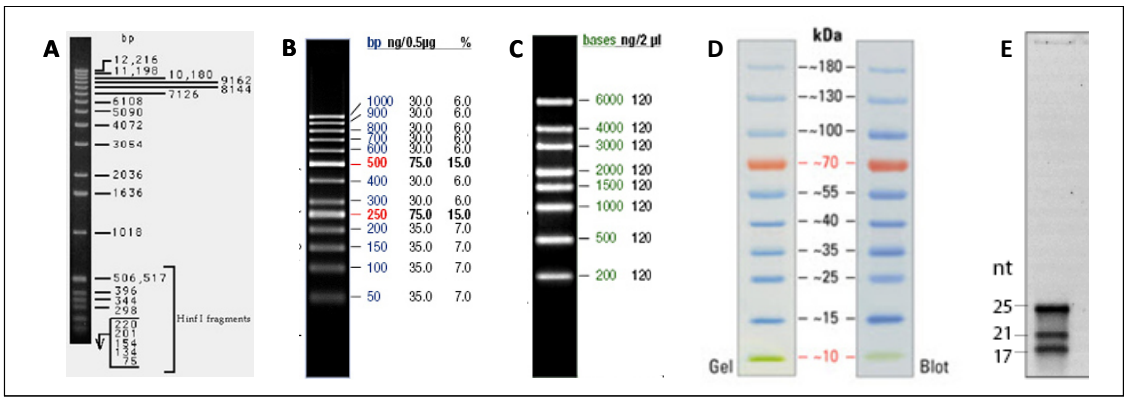

Abbildung 2.1 DNA- und RNA Größenstandards. (A) 1 kb DNA Ladder (life technologies), (B) GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), (C) RiboRuler™ High Range RNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), (D) PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific), (E) microRNA Marker (NEB).

2.4 Präparation und Analyse von RNA

2.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Bei Bedarf wurden den Proben vor der Extraktion 25 fmol cap-Firefly Luciferase RNA, 25 fmol cap-CAT RNA oder 25 fmol cel-miR-39 pro Reaktion als Extraktionskontrolle zugegeben. Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen wurden die Proben mit 750 µl Trizol versetzt, 15 sec gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben erneut 15 sec gevortext und für 3 min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g wurde die Phasentrennung erreicht. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, gefolgt von einem zweiten Extraktionsschritt mit 500 µl Chloroform. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere Phase wieder in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, 10 µg Glykogen zugegeben und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben für 15 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde anschließend mit 80 %-igem Ethanol gewaschen und der Überstand vollständig entfernt. Nach dem Trocknen bei RT wurde die RNA in RNase-freiem, DEPC-behandelten Wasser gelöst und die Konzentration am NanoDrop (s. 2.3.10) bestimmt. Die Isolation von RNA nach der Immunopräzipization wird in Abschnitt 2.10 beschrieben.

2.4.2 Präparation von miRNAs aus humanem Serum

Zur Präparation von zirkulierenden miRNAs aus humanem Serum wurde das miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben mit nachstehenden Änderungen verwendet. Für die Generierung von Serum wurde gesunden Freiwilligen zunächst 10 ml Vollblut in Blutentnahmeröhrchen ohne Gerinnungshemmer abgenommen und die Proben für 10 min bei RT inkubiert. Durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 19.000 g und 4 °C wurden die zellulären Bestandteile des Blutes abgetrennt und die obere Serum-Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 16.000 g und 4 °C, zur Abtrennung verbliebener Zelltrümmer, wurde der Überstand auf neue Reaktionsgefäße verteilt und bei -80 °C gelagert. Für die Analyse von miRNAs im Serum von SIRS- und Sepsis-Patienten wurden Serumproben freundlicherweise von Prof. Dr. Gernot Marx und PD Dr. Tobias Schürholz (Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care, UK Aachen) zur Verfügung gestellt. Im Rahmen des Projektes *Adrenosep* wurde männlichen SIRS Patienten einen Tag nach der Operation sowie männlichen septischen Patienten am Tag der Sepsis-Diagnose sowie an Tag 3 nach der Diagnose Blut entnommen und Serum generiert. Zur Präparation der miRNAs wurden 400 µl Serum mit 1 ml Qiazol versetzt, gründlich gevortext und daraufhin für 5 min bei RT inkubiert. Nachdem den Proben 12.5 fmol cel-miR-39 als *spike-in* Kontrolle hinzugefügt wurde, wurde weiter nach Herstellerangaben verfahren.

2.4.3 DNase Verdau

Zur Analyse von miRNAs in BMDM im Northern Blot (s. 2.5) oder in der quantitativen PCR (s. 2.4.8) wurde die isolierte Gesamt-RNA zunächst mit DNase behandelt. Es wurden pro µg RNA 0,33 U RQ1 DNase (Promega) eingesetzt und in RQ1-Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reinigung erfolgte mittels Phenol-Chloroform Extraktion (s 2.4.4).

2.4.4 Phenol-Chloroform Extraktion

Durch Phenol-Chloroform Extraktion wurden Nukleinsäuren die Phenol-Kontaminationen aufwiesen erneut extrahiert, oder Restriktionsverdaue gereinigt (s. 2.3.4). Die Proben wurden mit DEPC-Wasser auf 100 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform versetzt. Daraufhin wurden die Proben gevortext und für 5 min bei RT und 20.230 g zentrifugiert. Dem Überstand wurde 100 µl Chloroform zugefügt und erneut für 2 min zentrifugiert. Die Nukleinsäuren wurden mit 10 µg Glykogen, 50 µl 4 M NH_4Ac (RNA) oder 3 M NaAc (DNA) und Ethanol absolut über Nacht bei -20 °C oder 30 min auf Eis gefällt. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 g. Das Pellet wurde mit 80 %-igem Ethanol gewaschen und die RNA oder DNA, wie in 2.4.1 beschrieben, aufbereitet.

2.4.5 Reverse Transkription von mRNAs

Zur Synthese von cDNA wurden 1 - 2 µg RNA entweder mit dem *Maxima H Minus First Strand cDNA synthesis* Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers umgeschrieben, oder die reverse Transkriptase von Promega genutzt. Letzteres umfasste zunächst die Inkubation der RNA mit 20 pmol *random hexamer* Primer (NEB) für 5 min bei 70 °C, worauf die Zugabe von 0,5 mM dNTPs, RT-Puffer und 150 U M-MLV RT und die Inkubation für 1 h bei 42 °C folgte. Das Enzym wurde anschließend bei 70 °C für 20 min inaktiviert.

2.4.6 Reverse Transkription von miRNAs

Für die Analyse der miRNA-Expression wurden 2 µg RNA mit dem miScript RT Kit II (Qiagen) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Da miRNAs nicht polyadenyliert sind, beinhaltet die Reaktion in einem ersten Schritt eine 3' Polyadenylierung der miRNAs. An diese poly(A)-Sequenz lagert sich ein Oligo-dT Primer mit einem universellem *tag* an, welcher für die spätere quantitative PCR der miRNAs benötigt wird. Für die Analyse von zirkulierenden miRNAs aus humanem Serum, wurden 12 µl der präparierten miRNAs (s. 2.4.2) in die reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt.

2.4.7 Semi-quantitative PCR

Die Primer für die semi-quantitative PCR wurden so entworfen, dass sie die Exon-Exon-Grenzen der mRNA überspannen und die PCR-Produkte eine Größe von 100 bis 300 bp aufweisen.

<u>25 µl Ansatz:</u>
5 x GoTaq Flexi Puffer
2 µl cDNA (s. 2.4.5)
200 µM dNTPs
1 µM *sense* Primer
1 µM *antisense* Primer
1,5 mM MgCl
1 U GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega)

Das folgende PCR-Programm wurde verwendet:

94 °C	3 min		initiale Denaturierung
x Zyklen:			
	94 °C	30 sec	Denaturierung
	57 °C	45 sec	Hybridisierung der Primer
	72 °C	30 sec	Elongation
72 °C	10 min		finale Elongation

Die Zyklenzahl war dabei abhängig von der Abundanz der untersuchten mRNAs. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf einem 2 %-igem Agarosegel. Der verwendete Reaktionspuffer enthielt bereits Glycerin und Farbstoffe, so dass die Proben vor dem Auftragen nicht mit DNA-Ladepuffer versetzt werden mussten.

Tabelle 8 Übersicht der verwendeten Primer in der semi-quantitativen PCR

ID	Orientierung	Sequenz (5' → 3')	Quelle
CAT	*sense*	GGAATTCCGTATGGCAATGA	(de Vries et al. 2013)
	antisense	GATTGGCTGAGACGAAAAAC	
TNF-α	*sense*	TCC CCA AAG GGA TGA GAA G	(Liepelt et al. 2014)
	antisense	GCA CCA CTA GTT GGT TGT C	
IL-1β	*sense*	AAA CCT TTG ACC TGG GCT GTC CTG	(Liepelt et al. 2014)
	antisense	AGA GGA TGG GCT CTT CTT C	
IL-6	*sense*	AAA CCT TTG ACC TGG GCT GTC CTG	(Overbergh et al. 1999)
	antisense	AGA GGA TGG GCT CTT CTT C	
IL-10	*sense*	GGC TGA GGC GCT GTC ATC G	(Boaru et al. 2012)
	antisense	TCA TTC ATG GCC TTG TAG ACA CC	
IL-10 3'UTR	*sense*	TCT GAT CCA GGG ATC TTA GC	diese Arbeit
	antisense	AGT GTC CCC AAT GGA AAC AG	
TRAF6 ORF	*sense*	ATC CTG AGC AGA TCG ACT GA	diese Arbeit
	antisense	TGC AGG CTT TGC AGA ACC T	
TRAF6 3'UTR	*sense*	AAT CAC CAC TGC CTG TGC TG	diese Arbeit
	antisense	GAT GCT TGG TGT TCA GTG GAC	
IRAK1 ORF	*sense*	ACAGCTATCAAGGTTTCGTCAC	Dissertation A. Liepelt, 2014
	antisense	AGAAGAATGTCCAGTCGTTGAG	
IRAK1 3'UTR	*sense*	CACTCTGACAAATCCCTCAG	diese Arbeit
	antisense	CTATCAAGTTCTTTGGCTGGC	
GAPDH ORF	*sense*	TTGTGGAAGGGCTCATGAC	(Liepelt et al. 2014)
	antisense	TCATACTTGGCAGGTTTCTCCAG	
GAPDH 3'UTR	*sense*	TAAGAAACCCTGGACCACCC	(De Santis et al. 2016)
	antisense	TTCAAGAGAGTAGGGAGGGC	
TLR4 3'UTR	*sense*	GGG CCT TTT GAA TAC AAG CC	diese Arbeit
	antisense	GCT ATC TGT GAG CGT GTA TC	
MAPK14 3'UTR	*sense*	GCC TTA AAA GGG TGA GAA GG	diese Arbeit
	antisense	CTT CCT AAA GGC TGC CTT GTT	
MAPK7 3'UTR	*sense*	AGG ATA GAC CCA GCA TCA AG	diese Arbeit
	antisense	GTC TCC TGG TCC TGT TAT G	
TIRAP 3'UTR-1	*sense*	AGG AAG CTG ATA CAT GGC TG	diese Arbeit
	antisense	GAG GTG AGT TGA CAT CTC TG	
TIRAP 3'UTR-2	*sense*	TTA GCA TAC CTG AGG GCT TG	diese Arbeit
	antisense	CTG TCC TGG AAC TCT GTA GA	
TIRAP 3'UTR-3	*sense*	AGC AGT TCT CCA CCC TTT AC	diese Arbeit
	antisense	TCA AAT GCA CCA GAA GAG GG	

ID	Orientierung	Sequenz (5' → 3')	Quelle
CASP-3 3'UTR	*sense*	TAC CTC AAC TTC GAC ATC AGG	(De Santis et al. 2016)
	antisense	CAG TGG AAA AGC TGT ACT GC	
IKKε 3'UTR	*sense*	GGC AAG TTC TGG TTC CAT CTC	(De Santis et al. 2016)
	antisense	CCG CAT GGT CTC TTC TGT AG	
TAB2 3'UTR	*sense*	CAT GCT CCT TTT AAG CCT TAC C	(De Santis et al. 2016)
	antisense	GCA GCA CCT GCA TGT CTT C	

Die Primer für die Zytokine, sowie für CAT wurden auch für die quantitative PCR verwendet (s. 2.4.7)

2.4.8 Quantitative PCR

Zur quantitativen Expressionsanalyse spezifischer mRNAs und miRNAs wurden die qPCR angewandt. Für die Untersuchung der mRNA Expression wurde die wie in 2.4.5 beschrieben generierte cDNA 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

10 µl PCR-Ansatz
2 x Power SYBR Green Master Mix (life technologies)
200 nM *sense* Primer
200 nM *antisense* Primer
4,6 µl verdünnte cDNA

Für die Analyse der miRNA Expression wurde das SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) genutzt. Die wie in 2.4.6 beschrieben generierte cDNA wurde 1:20 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Die cDNA die aus zirkulierenden miRNAs generiert wurde, wurde 1:7 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Der PCR-Ansatz zur Bestimmung der miRNAs enthält neben dem Mastermix einen miRNA-spezifischen *sense* Primer, und als *antisense* Primer den im Kit enthaltenen Universal Primer, welcher spezifisch mit dem, während der reversen Transkription (s. 2.4.6) erzeugten, *tag* hybridisiert. Für die Bestimmung von miRNAs aus Zellen wurden 15 µl Ansätze gewählt, zur Analyse von zirkulierenden miRNAs wurden 25 µl Ansätze pipettiert.

15 µl PCR-Ansatz
7,5 µl SYBR Green
1 µM miRNA Primer
1 µM Universal Primer
4,5 µl verdünnte cDNA (1:20)

25 µl PCR Ansatz
12,5 µl SYBR Green
1 µM miRNA Primer
1 µM Universal Primer
3 µl ddH_2O
4,5 µl verdünnte cDNA (1:7)

Tabelle 9 Übersicht der verwendeten miRNA Primer

ID	miBase Eingangsnr.	Sequenz (5' → 3')
RNU6B_for		CGC AAG GAT GAC ACG CAA ATT
mir-146a_for	MIMAT0000158	TGA GAA CTG AAT TCC ATG GGT T
mir-146b_for	MIMAT0003475	TGA GAA CTG AAT TCC ATA GGC T
mir-155_for	MIMAT0000165	TTA ATG CTA ATT GTG ATA GGG GT
miR-93_5p_for	MIMAT0000540	CAA AGT GCT GTT CGT GCA GGT AG
miR-182_5p_for	MIMAT0000211	TTT GGC AAT GGT AGA ACT CAC ACC G
mir-141_for	MIMAT0000153	TAA CAC TGT CTG GTA AAG ATG G
miR-103-2_3p_for	MIMAT0000546	AGC AGC ATT GTA CAG GGC TAT GA
let7a-2_5p_for	MIMAT0000521	TGA GGT AGT AGG TTG TAT AGT T
miR-24-2_3p_for	MIMAT0000219	TGG CTC AGT TCA GCA GGA ACA G
miR-378_3p_for	MIMAT0003151	ACT GGA CTT GGA GTC AGA AGG
miR-340_5p_for	MIMAT0004651	TTA TAA AGC AAT GAG ACT GAT T
miR-877_5p_for	MIMAT0004861	GTA GAG GAG ATG GCG CAG GG
miR-30d_5p_for	MIMAT0000515	TGT AAA CATCCC CGA CTG GAA G
miR-16-2_5p_for	MIMAT0000527	TAG CAG CAC GTA AAT ATT GGC G
miR-183_5p_for	MIMAT0000212	TAT GGC ACT GGT AGA ATT CAC T
miR-101b_3p_for	MIMAT0000616	TAC AGT ACT GTG ATA GCT GAA
miR-96_5p_for	MIMAT0000541	TTT GGC ACT AGC ACA TTT TTG CT
miR-200c_3p_for	MIMAT0000657	TAA TAC TGC CGG GTA ATG ATG GA
miR-339_5p_for	MIMAT0000584	TCC CTG TCC TCC AGG AGC TCA
miR-30c-1_5p_for	MIMAT0000514	TGT AAA CAT CCT ACA CTC TCA GC
miR-15b_5p_for	MIMAT0000124	TAG CAG CAC ATC ATG GTT TAC A
miR-10a-5p_for	MIMAT0000648	TAC CCT GTA GAT CCG AAT TTG TG
miR-342_3p_for	MIMAT0000590	TCT CAC ACA GAA ATC GCA CCC GT
miR-221_3p_for	MIMAT0000669	AGC TAC ATT GTC TGC TGG GTT TC
miR-194-2_5p_for	MIMAT0000224	TGT AAC AGC AAC TCC ATG TGG A
miR-212_3p_for	MIMAT0000659	TAA CAG TCT CCA GTC ACG GCC A
miR-374_5p_for	MIMAT0003727	ATA TAA TAC AAC CTG CTA AGT G
cel-miR-39_3p_for	MIMAT0000010	TCACCGGGTGTAAATCAGCTTG
cel-miR-39 RNA		UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
hsa-miR-150_for	MIMAT0000451	TCT CCC AAC CCT TGT ACC AGT G
hsa-miR-4772-5p-iso_for		TCT GAT CAG GCA AAA TTG CAG A (Ma et al. 2013)
hsa-miR-223-3p_for	MIMAT0000280	TGT CAG TTT GTC AAA TAC CCC A
hsa-miR-574-5p_for	MIMAT0004795	TGA GTG TGT GTG TGT GAG TGT GT

Die qPCR-Messungen wurden mit dem StepOnePlus System (life technologies) durchgeführt. Die relative Expression wurde mit der $\Delta\Delta C_T$-Methode ermittelt (Livak und Schmittgen 2001), indem auf die Extraktionskontrolle oder ein Referenzgen normalisiert wurde.

Tabelle 10 Übersicht der verwendeten qPCR Primer für die mRNA Analyse

ID	Orientierung	Sequenz (5' → 3')	Quelle
CAT	*sense*	GGAATTCCGTATGGCAATGA	(de Vries et al. 2013)
	antisense	GATTGGCTGAGACGAAAAAC	
NDUFV1	*sense*	GCC TCC AAT TTG CAG GTA GCT AT	(Su et al. 2007)
	antisense	CAC GCA CCA CAA ACA CAT CA	
CASP-3	*sense*	CCA ACC TCA GAG AGA CAT TC	(De Santis et al. 2016)
	antisense	TTT CGG CTT TCC AGT CAG AC	
IKKε	*sense*	ACC TGC AGT TCT GGT TCC ATC	(De Santis et al. 2016)
	antisense	GCT GCT CGA GAA TCC TCA AAG	
RPS7	*sense*	GGT GGT CGG AAA GCT ATC A	(De Santis et al. 2016)
	antisense	AAG TCC TCA AGG ATG GCG T	

2.5 Northern Blot Analysen

2.5.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Die radioaktive Markierung der Oligonukleotide und des microRNA-Markers (s. Abbildung 2.1E, NEB) erfolgte mit γ-^{32}P ATP (Hartmann Analytic) für 30 min bei 37 °C. Die Reinigung der Ansätze wurde mit G25 *spin columns* (GE Healthcare) durchgeführt, wobei die Ansätze für 2 min bei 4 °C und 700 g zentrifugiert und somit nicht eingebaute Nukleotide entfernt wurden. Durch die Zugabe von 30 µl 30 mM EDTA wurde die T4 Polynukleotid Kinase (PNK, NEB) inaktiviert. Tabelle 11 zeigt die Übersicht der verwendeten radioaktiv markierten Northern Blot Sonden.

20 µl Ansatz	
10 µM Oligonukleotid	2 µl
oder	
microRNA Marker	3 µl
γ-^{32}P ATP (3000 Ci/mmol)	2 µl
T4 PNK Puffer	2 µl
1 U/µl T4 PNK	1 µl
ad DEPC-H_2O	20 µl

2.5.2 Polyacrylamidgelelektrophorese und Transfer der RNA

Für den Nachweis spezifischer miRNAs wurden Northern Blot Experimente in Anlehnung an ein Protokoll von (Pall und Hamilton 2008) durchgeführt. Je nach zu erwartender Abundanz der miRNAs, abgeleitet aus den Sequenzierergebnissen der cDNA Bibliotheken (s. 3.2), wurden 10 - 40 µg Gesamt-RNA auf einem 12 %-igem Harnstoffgel aufgetrennt. Die RNA wurde dabei zunächst mit RNA-Ladepuffer vermischt und für 1 min bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandard

wurde der microRNA Marker (NEB) mitgeführt, der sich aus drei synthetischen, einzelsträngigen RNA-Oligonukleotiden (17 nt, 21 nt und 25 nt) zusammensetzt und sich bereits in Ladepuffer befand. Der Marker wurde bei 95 °C für 5 min denaturiert. Das Gel wurde zunächst in 1 x TBE Laufpuffer (s. 2.3.11) für 10 min bei 300 V erwärmt und die Taschen des Gels vor dem Beladen gründlich mit 1 x TBE gespült. Der Gellauf erfolgte im Laufpuffer bei 100 V für 2 h, bis die Lauffront ca. 6 cm in das Gel migriert war. MiRNAs laufen dabei etwa 1 cm über der Lauffront. Im Anschluss erfolgte der Transfer der miRNAs auf eine Nylonmembran (Hybon-N, GE Healthcare) mit einer *semi-dry* Blot-Apparatur für 30 min bei 20 V. Auf diese Weise können miRNAs effizient auf die Membran übertragen werden, während längere RNA Moleküle schlechter transferiert werden.

Zur Herstellung des Gels den Harnstoff zunächst in TBE-Puffer und Wasser auf einem Heizrührer aufkochen lassen bis dieser sich vollständig gelöst hat. Nach dem Abkühlen wurde das Polyacrylamid hinzugefügt.

12 % Polyacrylamidgel, 7 M Urea

210,21 g	Urea
50 ml	10 x TBE
100 ml	ddH_2O
150 ml	40 % Polyacrylamid (19:1)
ad 500 ml	ddH_2O

RNA Ladepuffer

90 % (v/v)	Formamid
0,025 % (w/v)	Xylencyanol
0,025 % (w/v)	Bromphenolblau

2.5.3 Kovalente Bindung und Hybridisierung von miRNA Sonden

Durch chemische Vernetzung wurde die RNA im Anschluss an den Transfer kovalent an die Membran gebunden. Die Membran wurde auf ein mit EDC-Reagenz getränktes Blotting-Papier gelegt, in Folie eingewickelt und für 1 h bei 50 °C inkubiert. Danach wurde die Membran in Wasser gewaschen, mit einem Fön getrocknet und über Nacht mit 20 µl der radioaktiv-markierten miRNA-Sonde in Hybridisierungspuffer bei 50 °C hybridisiert. Als Ladekontrolle wurde dem Hybridisierungspuffer zusätzlich 20 µl der radioaktiv-markierten U6 snRNA Sonde hinzugefügt sowie die gleiche Menge an radioaktiv-markiertem miRNA Marker.

Am darauffolgenden Tag wurde die Hybridisierungslösung abgenommen und die Membran zweimal mit Waschpuffer I für 10 min bei 50 °C gewaschen. Nach einem weiteren Waschschritt mit Waschpuffer II für 10 min bei 50 °C, wurde die Membran in Folie gewickelt und für die

Detektion der miRNAs ein Film (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) aufgelegt. Die Detektion erfolgte mit einem Phosphoimager (Optimax).

EDC Reagenz, pH 8:	
6 ml	ddH_2O
127,6 mM	1-Methylimidazol
12,5 mM	HCl
376,5 mg	EDC
ad 12 ml	ddH_2O

20 x SSC, pH 7,0:	
3 M	Natriumchlorid
300 mM	Natriumcitrat
ad 1000 ml	ddH_2O
pH einstellen mit HCl	

50 x Denhardt's Lösung:	
1 % (w/v)	Albumin V
1 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
1 % (w/v)	Ficoll 400
ad 50 ml	ddH_2O
fällt aus, löst sich erst bei 50 °C	

Hybridisierungslösung:	
5 x	SSC
7 % (v/v)	SDS
20 mM	Na_2HPO_4, pH 7,2
1 x	Denhardt's Lösung
ad 50 ml	ddH_2O

Waschpuffer I:	
5 x	SSC
1 % (v/v)	SDS
ad 1000 ml	ddH_2O

Waschpuffer II	
1 x	SSC
1 % SDS (v/v)	SDS
ad 1000 ml	ddH_2O

Tabelle 11 Übersicht der verwendeten Northern Blot Sonden

ID	miRNA	miBase Eingangsnr.	Sonden-Sequenz (5' → 3')
U6 snRNA_NB	U6 snRNA		GAATTTGCGTGTCATCCTTGCGCAGGGGCCATGCTAA
146a_5p_NB	miR-146a-5p	MIMAT0000158	AACCCATGGAATTCAGTTCTCA
146b_5p_NB	miR-146b-5p	MIMAT0003475	AGCCTATGGAATTCAGTTCTCA
155_5p_NB	miR-155-5p	MIMAT0000165	ACCCCTATCACAATTAGCATTAA
93_5p_NB	miR-93-5p	MIMAT0000540	CTACCTGCACGAACAGCACTTTG
182_5p_NB	miR-182-5p	MIMAT0000211	CGGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA
141_3p_NB	miR-141-3p	MIMAT0000153	CCATCTTTACCAGACAGTGTTA
103-2_3p_NB	miR-103-2-3p	MIMAT0000546	TCATAGCCCTGTACAATGCTGCT
let7a-2_5p_NB	let-7a-5p	MIMAT0000521	AACTATACAACCTACTACCTCA
24-2_3p_NB	miR-24-3-3p	MIMAT0000219	CTGTTCCTGCTGAACTGAGCCA
378_3p_NB	miR-378-3p	MIMAT0003151	CCTTCTGACTCCAAGTCCAGT
340_5p_NB	miR-340-5p	MIMAT0004651	AATCAGTCTCATTGCTTTATAA
877_5p_NB	miR-877-5p	MIMAT0004861	CCCTGCGCCATCTCCTCTAC
30d_5p_NB	miR-30d-5p	MIMAT0000515	CTTCCAGTCGGGGATGTTTACA
16-2_5p_NB	miR-16-2-5p	MIMAT0000527	CGCCAATATTTACGTGCTGCTA
183_5p_NB	miR-183-5p	MIMAT0000212	AGTGAATTCTACCAGTGCCATA
101b_3p_NB	miR-101b-3p	MIMAT0000616	TTCAGCTATCACAGTACTGTA
96_5p_NB	miR-96-5p	MIMAT0000541	AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAA

ID	miRNA	miBase Eingangsnr.	Sonden-Sequenz (5' → 3')
200c_3p_NB	miR-200c-3p	MIMAT0000657	TCCATCATTACCCGGCAGTATTA
339_5p_NB	miR-339-5p	MIMAT0000584	CGTGAGCTCCTGGAGGACAGGGA
30c-1_5p_NB	miR-30c-1-5p	MIMAT0000514	GCTGAGAGTGTAGGATGTTTACA
15b_5p_NB	miR-15b-5p	MIMAT0000124	TGTAAACCATGATGTGCTGCTA
10a_5p_NB	miR-10a-5p	MIMAT0000648	CACAAATTCGGATCTACAGGGTA
342_3p_NB	miR-342-3p	MIMAT0000590	ACGGGTGCGATTTCTGTGTGAGA
221_3p_NB	miR-221-3p	MIMAT0000669	GAAACCCAGCAGACAATGTAGCT
194_5p_NB	miR-194-5p	MIMAT0000224	TCCACATGGAGTTGCTGTTACA
212_3p_NB	miR-212-3p	MIMAT0000659	TGGCCGTGACTGGAGACTGTTA
374_5p_NB	miR-374-5p	MIMAT0003727	CACTTAGCAGGTTGTATTATAT

2.6 *In vitro* Transkription

Zur Herstellung von Reporter mRNAs mit 5' cap und 3' poly(A_{98}) Schwanz für die *in vitro* Translation sowie für die Extraktions- und *spike-in* Kontrollen, wurde die jeweilige Plasmid-DNA zunächst durch Restriktionsendonukleasen linearisiert. Die Plasmide für die spätere *in vitro* Translation wurden mit *Kpn1* (NEB) geschnitten. Für die *in vitro* Transkription wurde 1 µg der gereinigten, linearisierten DNA eingesetzt und mit dem T7 MEGAscript® Kit (Ambion) nach Angaben des Herstellers für 3-4 h bei 37 °C transkribiert. Dabei wurde den Ansätzen zusätzlich 40 mM Cap-Analogon (m^7GpppG) zugegeben und die GTP-Menge auf 15 mM angepasst. Für die Entfernung verbliebener DNA wurde den Ansätzen anschließend 1 µl TURBO DNase (Ambion) zugefügt und für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Die folgende Reinigung der RNA erfolgte mittels Phenol und Phenol-Chloroform Extraktion und im letzten Schritt über Chroma-Spin-100 Säulen (Takara Bio) nach Herstellerangaben. Die RNA wurde über Nacht mit 10 µg Glykogen, 10 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl Ethanol bei -20 °C gefällt. Am darauffolgenden Tag wurde die RNA durch Zentrifugation bei 4 °C und 20.000 g für 30 min präzipitiert. Nach einem Waschschritt mit 80 %-igem Ethanol wurde die RNA in 40 µl DEPC H_2O gelöst. Zur Überprüfung der RNA-Integrität und der Transkriptlänge wurde die RNA auf einem 1,5 %-igem Agarosegel analysiert. Um die Transkripte vor Abbau zu schützen, wurde den Proben je 40 U Ribolock hinzugefügt und bei -80 °C gelagert.

2.7 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation erfolgte in 10 µl Ansätzen für 30 min bei 37 °C im Wasserbad. Vor der Translationsreaktion erfolgte eine 20-minütige Vorinkubation der Ansätze bei 16 °C. Ein Ansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

10 µl Ansatz:

4 µl	zytoplasmatischer Extrakt (s. 2.2.4)
0,5 µl	2 mM Aminosäuren
0,16 µl	1 M Hepes, pH 7,6
0,2 µl	4 mg/ml bovine tRNA
0,08 µl	100 mM ATP
0,1 µl	10 mM GTP
0,08 µl	5 µg/µl Kreatinkinase
0,2 µl	1 M Kreatinphosphat
1 µl	600 mM Kaliumacetat
1 µl	25 mM Magnesiumacetat
1 µl	RNA (s. 2.6)

DIe *in vitro* Translationsreaktionen enthielten 45-57 µg zytoplasmatischen Extrakt und 1,25 fmol 5' cap fLUC-CASP-3 poly(A_{98})und 0,125 fmol 5' cap rLUC poly(A_{98}) bzw. 0.625 fmol 5' cap fLUC-IKKε poly(A_{98})und 0.0625 fmol 5' cap rLUC poly(A_{98}). Die Bestimmung der Aktivität der Firefly Luciferase und der *Renilla* Luciferase erfolgte mit Hilfe des *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) mit einem Luminometer.

2.8 Bestimmung von RNA-Stabilitäten

Um die Stabilität der RNA Transkripte zu bestimmen, wurden die genannten Reporter mRNAs, wie in 2.7 beschrieben, inkubiert und translatiert. Vor der Präparation der Gesamt-RNA mit Trizol wurde den Proben 0,5 fmol 5' cap CAT mRNA als Extraktionskontrolle zugefügt. Die Luciferase mRNAs und die CAT mRNA wurden mittels qPCR bestimmt und das Verhältnis der Reporter mRNAs vor und nach der Translation ermittelt. Die relative Firefly Luciferase Stabilität wurde dann aus dem Quotienten von Firefly Luciferase zu *Renilla* Luciferase bestimmt.

2.9 Analyse von Proteinen

2.9.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Proteinkonzentration von zytoplasmatischen Extrakten und Tritonlysaten wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Dafür wurde das Roti-Quant-Reagenz (Carl Roth) 1:5 mit ddH_2O verdünnt. Zur Messung wurde 1 µl der Proben mit 1 ml Reagenz 5 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels Eichgeraden, die mit BSA erstellt wurden.

2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur denaturierenden Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurden 10-15 %-ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Vor dem Beladen wurden die Proteinproben mit 2-bzw. 4-fach SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine wurde in einem diskontinuierlichen System, bestehend aus Sammelgel und Trenngel, durchgeführt (Laemmli 1970). Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Laufpuffer bei 180 V bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Für die Zuordnung der Proteinbanden zu einem bestimmten Molekulargewicht wurde ein bereits vorgefärbter Proteinmarker mitgeführt (s. Abbildung 2.1D).

Sammelgel	Trenngel
5 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	10-15 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
125 mM Tris HCl, pH 6.8	375 mM Tris HCl, pH 8.7
0,1 % APS	0,1 % APS
0,0004 % TEMED	0,0004 % TEMED

2 x SDS-Probenpuffer	4 x SDS-Probenpuffer	10 x Laufpuffer
250 mM Tris HCl, pH 6,8	250 mM Tris/HCl, pH 6,8	250 mM Glycin
4 % SDS	8 % SDS	25 mM Tris
20 % Glycerin	40 % Glycerin	3,5 mM SDS
10 % β-Mercaptoethanol	5 % β-Mercaptoethanol	
0,02 % Bromphenolblau	0,04 % Bromphenolblau	

2.9.3 Silberfärbung von SDS-Gelen

Die Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen erfolgte nach (Nesterenko et al. 1994). Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel für 5 min in Fixierlösung fixiert und danach mit Wasser gewaschen. Es erfolgte eine Vorbehandlung für 5 min in 50 % (v/v) Aceton und für 1 min mit 0,03 % (w/v) Natriumthiosulfat, gefolgt von einem Waschschritt. Anschließend wurde das Gel mit Imprägnierlösung für 8 min imprägniert und nach erneutem Waschen in Entwicklerlösung für 10 bis 60 sec inkubiert. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von 1 % (v/v) Essigsäure abgestoppt, sobald die gewünschte Farbintensität erreicht war.

Fixierlösung	Imprägnierlösung
50 % Aceton (v/v)	0,2 % Silbernitrat (w/v)
1,25 % Trichloressigsäure (w/v)	1 % Formaldehyd (v/v)
0,04 % Formaldehyd (v/v)	

Entwicklerlösung
2 % Natriumcarbonat (w/v)
0,04 % Formaldehyd (v/v)
0,008 % (w/v) Natriumthiosulfat

2.9.4 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE (s. 2.9.2) erfolgte der elektrophoretische Transfer auf eine PVDF-Membran (Millipore) zum spezifischen Nachweis der Proteine mittels Western Blot. Der Transfer wurde in einer Nass-Blot-Apparatur (Biorad) in 1 x Transferpuffer über Nacht bei 4 °C und 25 V durchgeführt. Für den Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran wurde eine *semi-dry* Blotapparatur verwendet und der Transfer erfolgte für 45 min bei 20 V in 1 x Transferpuffer, dem Methanol hinzugefügt wurde. Die Membran wurde anschließend für 1 h bei RT geblockt und mit dem Primärantikörper für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit TBST-Puffer erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers für 1 h bei RT. Die Inkubationsbedingungen unterschieden sich je nach verwendetem Primärantikörper und sind in Tabelle Anhang 2 aufgeführt. Nach fünfmaligem Waschen für je 5 min mit TBST-Puffer, wurde die Membran mit dem Substrat für die an den Sekundärantikörper gekoppelte *horseradish peroxidase* (HRP) inkubiert. Für gut detektierbare Proteine wurde das *SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate* und für schlechter detektierbare Proteine das *ECL Prime WB Detection reagent* verwendet. Nach Inkubation für 1 min bei RT erfolgte die Detektion mit dem ImageQuant LAS 4000. Die Quantifizierung der Western Blots wurde mit der MultiGauge Software (Fujifilm) durchgeführt.

1 x Transferpuffer
25 mM Tris
190 mM Glycin
20 % Methanol (semi-dry)

TBST-Puffer
50 mM Tris HCl, pH 7.4
150 mM NaCl
0,05/0,1 % (v/v) Tween-20

Tabelle 12 Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Antigen	Firma (Klon)	Katalognr.	Typ
Ago2	Wako Chemicals (2D4)	014-22023	Maus, monoklonal
α-TUBULIN	Sigma-Aldrich (DM1A)	T9026	Maus, monoklonal
CASP-3/cleaved CASP-3	Santa Cruz (31A1067)	sc-56053	Maus, monoklonal
CASP-3	Cell Signaling (*CASP-3 Detection Kit*)	9660	Kaninchen, polyklonal
CD63	Santa Cruz (H-193)	sc-15363	Kaninchen, polyklonal
ERK1/2	Cell Signaling	9102	Kaninchen, polyklonal
GAPDH	Abcam (6C5)	ab9484	Maus, monoklonal

Antigen	Firma (Klon)	Katalognr.	Typ
GST*	Santa Cruz (B-14)	sc-138	Maus, monoklonal
IKKε	Cell Signaling (D20G4)	2905S	Kaninchen, monoklonal
p38	Santa Cruz	sc-7149	Kaninchen, polyklonal
PARP-1	Cell Signaling (46D11)	9532	Kaninchen, monoklonal
phospho-ERK1/2	Cell Signaling	9101	Kaninchen, polyklonal
phospho-p38	Cell Signaling (28B10)	9216	Maus, monoklonal
TAB2	Santa Cruz (K-20)	sc-11851	Ziege, polyklonal
TRAF6	Santa Cruz (D-10)	sc-8409	Maus, monoklonal
VINCULIN	Sigma-Aldrich	V9131	Maus, monoklonal

* Der GST-Antikörper wurde als Kontrolle in der Ago2 IPP eingesetzt (s. 2.10)

Tabelle 13 Übersicht der im Western Blot verwendeten Sekundärantikörper

Antigen	Firma
anti-Kaninchen	GE Healthcare
anti-Kaninchen	Cell Signaling (CASP-3 Detection Kit)
anti-Maus	GE Healthcare
anti-Ziege	Santa-Cruz

2.10 Ago2 Immunopräzipitation

Die Ago2 Immunopräzipitation (Ago2 IPP) wurde in Anlehnung an das Protokoll von (Beitzinger und Meister 2011) durchgeführt. Es wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Ago2 (Wako Chemicals) und als Kontrolle ein monoklonaler Antikörper gegen GST (Santa Cruz) verwendet. Dabei wurden zunächst pro mg zytoplasmatischer Extrakt 6,25 µg des jeweiligen Antikörpers über Nacht mit 50 µl Protein G Agarose *beads* (Roche) bei 4 °C in einem Gesamtvolumen von 500 µl 1 x PBS auf einem Drehrad inkubiert. Sofern im Folgenden nicht anders erwähnt, erfolgten alle Schritte bei 4 °C, die Inkubationen erfolgten auf einem Drehrad und die Waschschritte beinhalteten 2 min auf dem Drehrad, gefolgt von einer Zentrifugation bei 1.500 g für 1 min. Die *beads* wurden zentrifugiert und einmal mit 1 ml IPP-Puffer gewaschen, in 500 µl 1 x PBS resuspendiert und bei 4 °C verwahrt. Der zytoplasmatische Extrakt wurde über Nacht mit den *beads* in 500 µl IPP-Puffer inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die *beads* fünfmal vorsichtig mit 1 ml IPP-Puffer gewaschen und ein letztes Mal mit 1 x PBS, um verbliebene Detergenzien zu entfernen. Für die Western Blot Analyse wurden 100 µl der *bead*-Suspension zentrifugiert und in 25 µl 2 x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Nach 10-minütiger Denaturierung der *beads* bei 95 °C wurden diese kurz zentrifguiert und 20 µl auf eine 10 % SDS-PAGE geladen. Die Detektion des immunopräzipitierten Ago2 Proteins wurde nach dem Standard Western Blot Protokoll durchgeführt (s. 2.9.4). Die verbleibenden 900 µl der *bead*-Suspension wurden für die Analyse von

co-präzipitierten mRNAs und miRNAs verwendet. Die *beads* wurden zunächst zentrifugiert und dann einem Proteinase K Verdau unterzogen, um die Proteine abzubauen. Dazu wurden die *beads* zuvor in 50 µl Proteinase K Puffer 30 min bei 65 °C unter leichtem Schütteln vorinkubiert. Danach wurde 20 mg/ml Proteinase K zu den Proben gegeben und 1 h bei 50 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Als Extraktionskontrollen wurde 25 fmol cap-CAT, 25 fmol cap-LUC RNA sowie 25 fmol cel-miR-39 hinzugegeben. Für die Isolation der RNA wurde den Proben 300 µl Phenol hinzugefügt, diese gevortext und bei 17.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion noch zweimal mit den gleichen Volumina Phenol-Chloroform bzw. Chloroform durchgeführt. Die RNA wurde über Nacht mit 20 µg Glykogen und 250 µl Ethanol absolut präzipitiert. Die Proben wurden 30 min bei 17.000 g und 4 °C zentrifugiert und das erhaltene RNA-Pellet mit 80 %-igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die RNA in 25 µl DEPC-H_2O für 10 min bei 55 °C und 750 rpm gelöst. Die Detektion co-präzipitierter mRNAs erfolgte mittels semi-quantitativer PCR (s. 2.4.7), die Expressionsanalyse der miRNAs mittels qPCR (s. 2.4.8)

IPP Puffer
20 mM Hepes, pH 7.4
100 mM KCl
5 mM MgAc
0,025 % Triton X-100
1 mM DTT
0,5 mM PMSF
2 µg/ml Leupeptin

2.11 Caspase-3 Aktivitätsmessung

Zur Bestimmung der Aktivität der gespaltenen CASP-3 wurde das Caspase-Glo® 3/7 *Assay System* (Promgea) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 12,5 µg CXT eingesetzt, sowie 5 U humaner, rekombinanter CASP-3 (Enzo Life Sciences) als Positivkontrolle.

2.12 Durchflusszytometrie

Für den Nachweis von apoptotischen RAW 264.7 Zellen wurden diese mit Annexin V-APC und 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) gefärbt und in Zusammenarbeit mit Dr. Anke Liepelt (Medizinische Klinik III) und Dr. med Jana Mossanen (Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in 12-*well* Platten ($0{,}98 \times 10^5$ pro well) in 2 ml Kulturmedium ausgesät. Nach 48 h erfolgte die LPS

Stimulation in 500 µl Kulturmedium. Die Staurosporin-Behandlung wurde wie in 2.2.7 durchgeführt. Für die Kombination der SSP-Behandlung mit der Transfektion der RAW 264.7 Zellen, wurde die antagomir-Transfektion 48 h vor der Zellernte wie in 2.2.5 durchgeführt und für die durchflusszytometrische Analyse 250.000 Zellen in 12-*well* Platten ausgesät. 15 min vor der Ernte wurden die Zellen mit 5 µl Annexin V-APC inkubiert. In apoptotischen Zellen wird das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) an die Oberfläche der Plasmamembran transportiert. Annexin V bindet mit hoher Affinität an PS, wobei diese Bindung Calcium-abhängig ist. Da das Kulturmedium bereits 1,8 mM $CaCl_2$ enthält, wurden die Zellen zunächst mit PBS, versetzt mit 1,8 mM $CaCl_2$, gewaschen und daraufhin in 500 µl FACS Puffer von den *wells* gekratzt. Nach Zugabe von 10 µl 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) erfolgte die durchflusszytometrische Analyse (LSRFortessa, BD Biosciences). Die Analyse der Daten wurde mit FlowLogic (Inivai) und Flowjo (Tree Star) durchgeführt.

FACS Puffer
2mM EDTA
0,1 % BSA
PBS
3,8 mM $CaCl_2$

2.13 Statistische Auswertungen

Wurden mehrere Experimente durchgeführt, wurden die Mittelwerte der gewonnenen Ergebnisse sowie die Standardabweichung ermittelt. Letztere ist in den Diagrammen durch Fehlerbalken angegeben. Die Standardabweichung wurde in der Annahme berechnet, dass die Ergebnisse eine Stichprobe repräsentieren und ist ein Maß dafür, wie die Werte um den Mittelwert streuen.

Durch studentsche t-Verteilung wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen drei Ergebnissen ermittelt. Es wurde ein zweiseitiger, heteroskedastischer t-Test durchgeführt und die erhaltenen P-Werte wie folgt im Diagramm dargestellt: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. Der P-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, ein solches Ergebnis zu erhalten, wenn die verglichenen Populationen deckungsgleich sind (Nullhypothese).

3 Ergebnisse

3.1 Die LPS-induzierte Aktivierung von Makrophagen

Als Immunzellen erkennen Makrophagen eindringende Pathogene vorwiegend durch die Familie der *toll-like* Rezeptoren. Die Bindung von LPS an den TLR4 induziert eine Reihe von intrazellulären Signalwegen, die zur Aktivierung von MAPKs und letztlich zur Ausschüttung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen führen (Takeda und Akira 2004; Akira et al. 2006). Es wurde zunächst die LPS-Antwort in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS (präpariert aus *E. coli*, Sigma-Aldrich) inkubiert. Der zeitliche Verlauf der so ausgelösten inflammatorischen Antwort konnte in den Makrophagen durch die Aktivierung von Proteinkinasen des TLR4-Signalwegs (s. Abbildung 3.1A) und auf Ebene der Expression von Zytokin mRNAs verfolgt werden (s. Abbildung 3.1B).

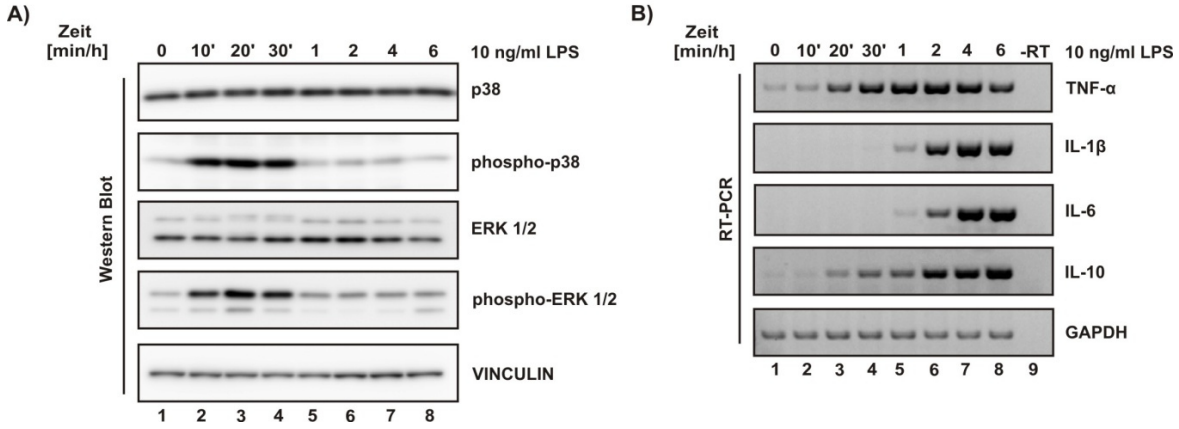

Abbildung 3.1 Aktivierung von Proteinkinasen und die Zytokin mRNA Expression im zeitlichen Verlauf der LPS-Antwort in RAW 264.7 Zellen. (A) RAW 264.7 Zellen wurden bis zu 6 h mit 10 ng/ml LPS stimuliert und die Phosphorylierung der Proteinkinasen p38 und ERK 1/2 durch Western Blot Analysen detektiert. VINCULIN diente als Ladekontrolle. (B) RAW 264.7 Zellen wurden bis zu 6 h mit 10 ng/ml LPS inkubiert und die mRNA der inflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-6, IL-1β sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 mittels RT-PCR analysiert. GAPDH mRNA diente als Kontrolle.

Die Aktivierung der Proteinkinasen p38 und ERK 1/2 erfolgt durch Phosphorylierung (Raingeaud et al. 1996; Swantek et al. 1997), welche im Western Blot detektiert werden konnte (Abbildung 3.1A). Die Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2 geschieht zu einem frühen Zeitpunkt der LPS-Antwort. Bereits 10 min nach der LPS-Behandlung kann eine deutliche Aktivierung der beiden Kinasen festgestellt werden, welche nach 30 min wieder abnimmt (vergleiche Spuren 2-4).

Die Expression der für die pro-inflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1β und IL-6 sowie für das anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 kodierenden mRNAs wurde mittels RT-PCR detektiert. Abbildung 3.1B zeigt, dass die Zytokin mRNAs jeweils nach einem bestimmten Muster exprimiert werden. Während die Expression von TNF-α bereits nach 20 min LPS-Inkubation ansteigt und nach

etwa 4 h wieder sinkt, ist erst nach etwa 2 h eine deutliche Expression von IL-1β, IL-6 und IL-10 zu beobachten.

Sofern nicht anders beschrieben wurden RAW 264.7 Zellen im Folgenden für 6 h mit 10 ng/ml LPS behandelt, da hier die Expression der analysierten Zytokin-mRNAs detektiert werden konnte.

3.2 Identifizierung von differentiell regulierten miRNAs in Makrophagen

Eine unkontrollierte, exzessive inflammatorische Antwort kann in der Entwicklung von chronischen Entzündungen, Autoimmunkrankeiten oder Sepsis resultieren, weshalb eine strikte Regulation der Entzündungsreaktion erforderlich ist (Carpenter et al. 2014). Die post-transkriptionale Regulation der Genexpression wird zu einem wesentlichen Teil durch die Funktion von miRNAs kontrolliert. Ziel dieser Arbeit war die systematische Analyse von miRNA Expressionsprofilen während der Entzündungsreaktion von Maus-Makrophagen. Zu diesem Zweck wurden RAW 264.7 Zellen unbehandelt belassen oder für 6 h mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen isoliert und vier cDNA Bibliotheken generiert. Zum einen wurden Bibliotheken aus Gesamt-RNA kloniert, zum anderen wurde die RNA vor der Klonierung größenfraktioniert, um eine Anreicherung der miRNAs zu erreichen. Diese Vorarbeiten wurden von Dr. Anke Liepelt (neue Adresse: Medizinische Klinik III, UK Aachen) in Kooperation mit Dr. Anne Dueck und Prof. Gunter Meister (Universität Regensburg) durchgeführt (vergleiche dazu Dissertation A. Liepelt, 2014). Für die Identifizierung von differentiell regulierten miRNAs während der inflammatorischen Antwort von RAW 264.7 Zellen wurden die cDNA-Bibliotheken durch Hochdurchsatzsequenzierung analysiert. Die Sequenzierung der Bibliotheken erfolgte durch die Firma Fasteris SA (Plan-les-Ouates, Schweiz) mit einem Illumia Genome Analyzer IIx. Die Aufbereitung der Sequenzierdaten wurde von InteRNA Technologies B.V. (Utrecht, Niederlande) durchgeführt. Mittels der Datenbanken miRBase (Version 16) und miR-Intess^{TM} (Berezikov et al. 2007; Griffiths-Jones et al. 2008) konnten differentiell exprimierte miRNAs aus den klonierten RNA-Populationen identifiziert werden.

Der erste Schritt der Auswertung der aufbereiteten Sequenzierdaten beinhaltete die Einteilung der identifizierten miRNA-Kandidaten in miRNAs mit induzierter bzw. mit verminderter Expression nach LPS-Stimulation der RAW 264.7 Zellen. Hierbei wurde der Fokus auf die miRNAs gelegt, welche mindestens 30 *reads* (Sequenzierungen) in einer der beiden cDNA-Bibliotheken, die aus Gesamt-RNA kloniert wurden, erreicht hatten. Dabei wurde eine erhöhte Expression von 41 miRNAs in LPS-aktivierten Makrophagen detektiert, während die Expression von 84 miRNAs reduziert war. Diese miRNAs sind in der Übersicht in Abbildung 3.2 dargestellt sowie deren

relative Sequenzierhäufigkeit in Tabelle Anhang 3 und Tabelle Anhang 4 (s. Abschnitt 6) aufgelistet.

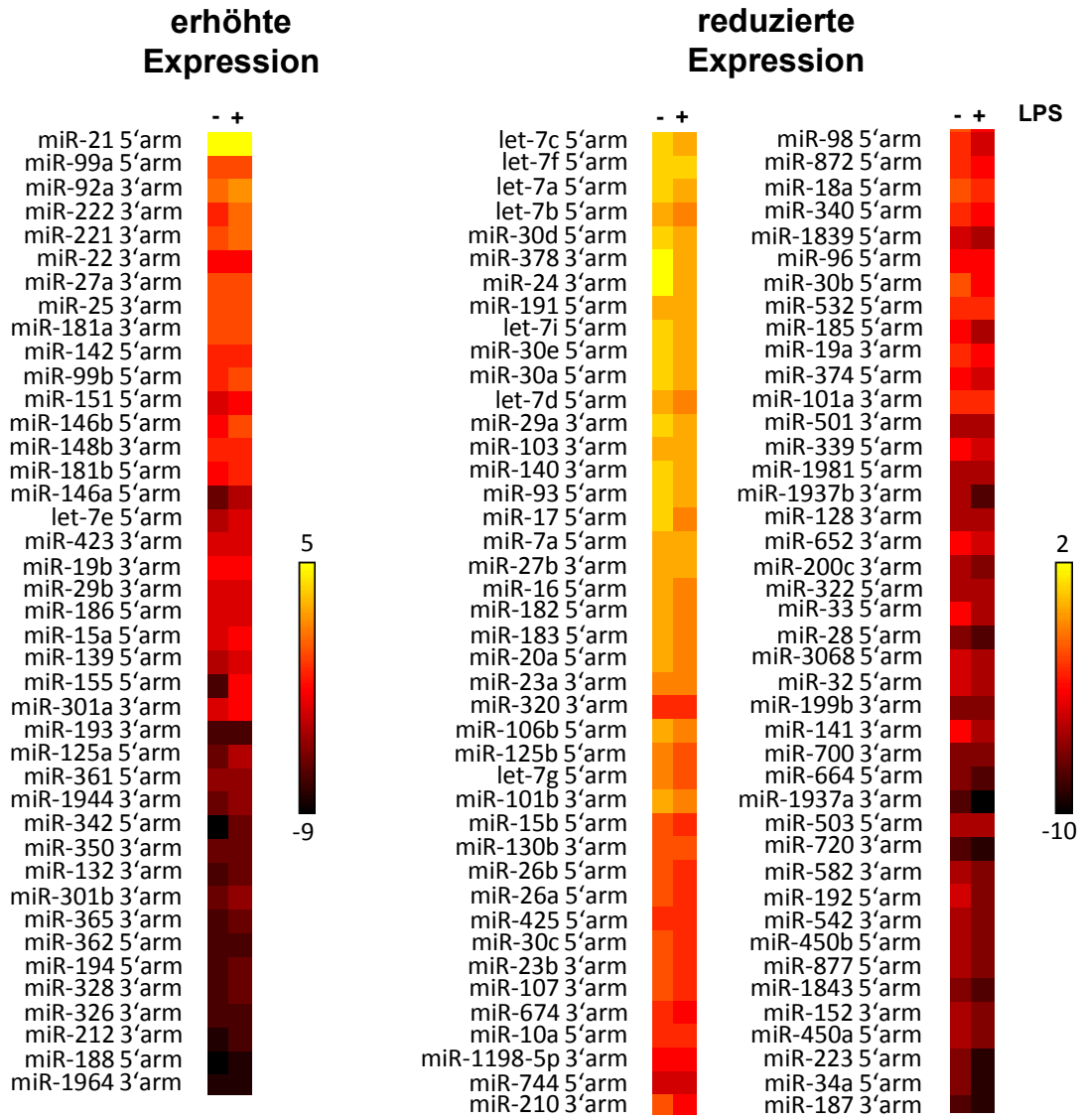

Abbildung 3.2 Identifizierung von differentiell regulierten miRNAs während der inflammatorischen Antwort in RAW 264.7 Zellen. Gesamt-RNA wurde aus unbehandelten (-) oder LPS-aktivierten (+) RAW 264.7 Zellen isoliert, cDNA-Bibliotheken generiert und diese mittels Hochdurchsatzsequenzierung analysiert. In der Übersicht ist die relative Häufigkeit der *reads* der miRNAs aus den Gesamt-RNA Bibliotheken in log2 gezeigt. Gelb repräsentiert eine hohe Expression der miRNAs, während rot eine geringe Expression darstellt. Insgesamt konnten 41 miRNAs mit einer erhöhten Expression (links) und 84 miRNAs mit einer reduzierten Expression (rechts) mit mehr als 30 *reads* durch die Hochdurchsatzsequenzierung identifiziert werden. (De Santis et al. 2016)

Im folgenden Schritt wurden drei Kriterien festgelegt, um die identifizierten miRNAs zunächst zu kategorisieren und daraufhin die Expression der differentiell regulierten miRNAs in RAW 264.7 Zellen durch Northern Blot Experimente und qPCR Analysen zu verifizieren. Erstens sollten die miRNAs mindestens 50 *reads* in der Hochdurchsatzsequenzierung erreicht haben. Zweitens sollte

die Änderung der Expression nach LPS-Behandlung mindestens 1,5-fach betragen. Drittens wurden *in silico* Vorhersagen dazu genutzt, miRNA Ziel-mRNAs die im Zusammenhang mit der inflammatorischen Antwort in Makrophagen stehen, zu identifizieren. MiRNAs die diese Kriterien erfüllten sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14 Übersicht der für die Validierung ausgewählten miRNAs (De Santis et al. 2016)

Erhöhte Expression	Reduzierte Expression	
miR-221 3'arm	let-7a 5'arm	miR-101b 3'arm
miR-146b 5'arm	miR-30d 5'arm	miR-15b 5'arm
miR-146a 5'arm	miR-378 3'arm	miR-30c 5'arm
miR-155 5'arm	miR-24 3'arm	miR-340 5'arm
miR-342 5'arm	miR-103 3'arm	miR-96 5'arm
miR-194 5'arm	miR-93 5'arm	miR-374 5'arm
miR-212 3'arm	miR-16 5'arm	miR-339 5'arm
	miR-182 5'arm	miR-200c 3'arm
	miR-183 5'arm	miR-141 3'arm

3.3 Validierung von differentiell regulierten miRNAs während der LPS-Antwort

Zur Validierung der Expression der ausgewählten miRNAs in RAW 264.7 Zellen wurden Northern Blots und qPCR Experimente durchgeführt. Diese Analysen zeigten, dass die Expression von vier miRNAs erhöht und von sieben miRNAs reduziert ist. Zu den LPS-induzierten miRNAs gehören miR-146a, miR-146b, miR-155 und miR-342 (s. Abbildung 3.3). In Tabelle 15 ist die jeweilige relative Sequenzierhäufigkeit der miRNAs, die in der Hochdurchsatzsequenzierung detektiert wurde, aufgelistet. MiR-155 zeigt dabei die am stärksten erhöhte Expression nach LPS-Behandlung (ca. 40-fach) (s. Tabelle 15 und Abbildung 3.3). Sowohl mittels qPCR als auch durch Northern Blot Experimente wurde eine signifikante, LPS-induzierte Expression von miR-155 bestätigt, wie sie auch in der Hochdurchsatzsequenzierung ermittelt wurde. Auch für die drei anderen miRNAs konnte die signifikant gesteigerte Expression in LPS-behandelten RAW 264.7 Zellen durch die Assays bestätigt werden (s. Abbildung 3.2 links, Tabelle 15 und Abbildung 3.3).

Tabelle 15 Relative Sequenzierhäufigkeit der miRNAs mit erhöhter Expression in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen

ID	0h	6h	x-fache Änderung
miR-146a 5'arm	0,008	0,033	4,1
miR-146b 5'arm	0,177	0,681	3,8
miR-155 5'arm	0,004	0,163	40,8
mir-342 5'arm	0,001	0,008	8

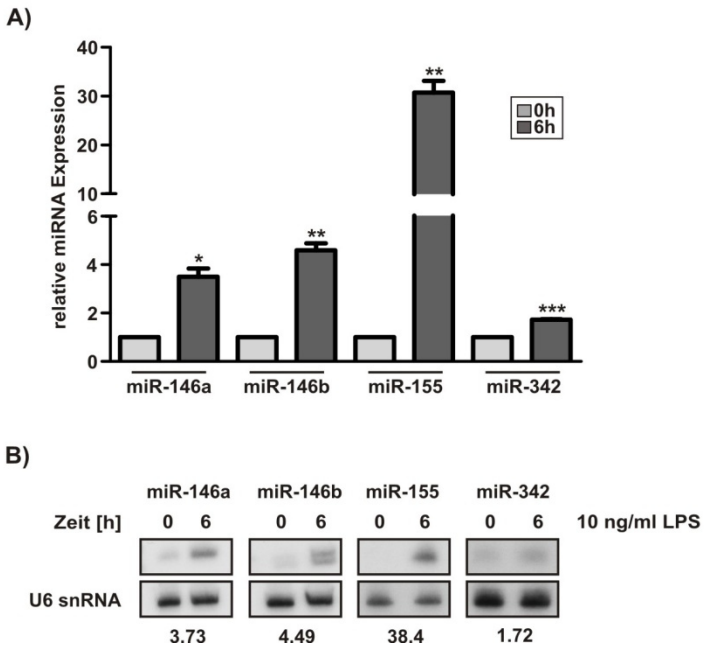

Abbildung 3.3 Validierung der miRNA Expression in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen. Die Gesamt-RNA wurde aus unbehandelten und LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen isoliert und mittels qPCR (A) und Northern Blot (B) analysiert. U6 snRNA diente als endogene Kontrolle. Die Quantifizierung der Northern Blots wurde mit MultiGauge (Fujifilm) durchgeführt.

Zu den miRNAs, die nach LPS-Exposition der Makrophagen eine verringerte Expression aufwiesen, zählen miR-93, miR-182, let-7a, miR-103, miR-24, miR-16 und miR-15b. In Tabelle 16 ist die jeweilige relative Sequenzierhäufigkeit der miRNAs, die in der Hochdurchsatzsequenzierung erreicht wurde, aufgelistet. Sowohl durch qPCR Experimente als auch durch Northern Blot Analysen konnte die durch LPS-Behandlung ausgelöste Abnahme der miRNA Expressionen in RAW 264.7 Zellen verifiziert werden (s. Abbildung 3.2 rechts, Tabelle 16 und Abbildung 3.4).

Tabelle 16 Relative Sequenzierhäufigkeit der miRNAs mit reduzierter Expression in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen

ID	0h	6h	x-fache Änderung
miR-93 5'arm	3,727	0,729	5,1
miR-182 5'arm	0,998	0,252	4,0
miR-103 3'arm	1,830	0,593	3,1
let-7a 5'arm	2,115	0,795	2,7
miR-24 3'arm	4,172	1,622	2,6
miR-16 5'arm	0,878	0,403	2,2
miR-15b 5'arm	0,137	0,085	1,6

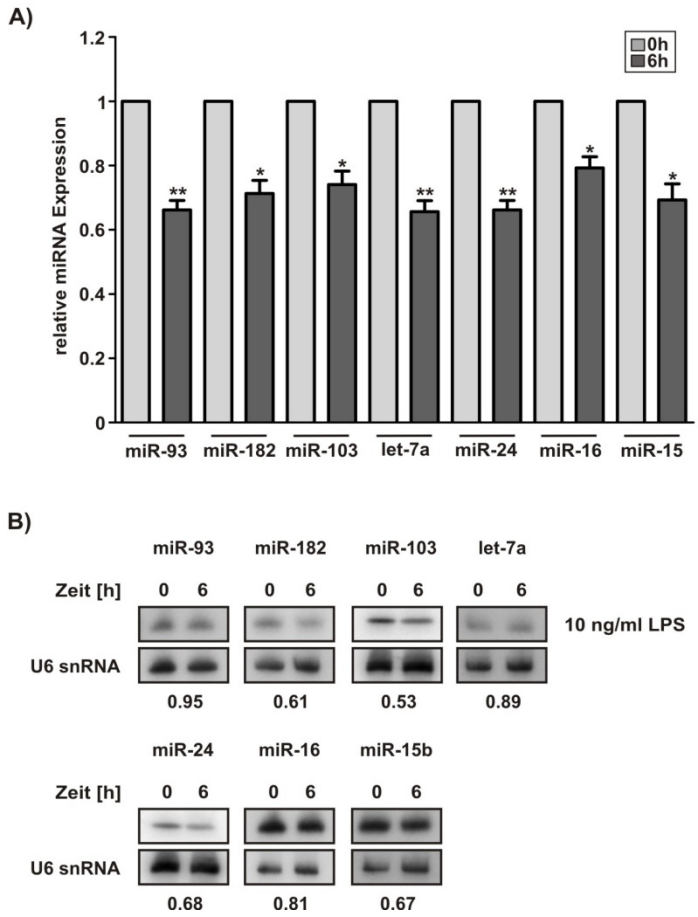

Abbildung 3.4 Validierung der miRNA Expression in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen. Die Gesamt-RNA wurde aus unbehandelten und LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen isoliert und mittels qPCR (A) und Northern Blot (B) analysiert. U6 snRNA diente als endogene Kontrolle. Die Quantifizierung der Northern Blots wurde mit MultiGauge (Fujifilm) durchgeführt.

Für die *in silico* Vorhersage potentieller miRNA Ziel-mRNAs wurde die Datenbank TargetScan™ (Version 5.2) genutzt, welche miRNA Ziel-mRNAs aufgrund der Konservierung der miRNA-Bindestelle in orthologen mRNA 3'UTRs von Vertebraten vorhersagt (Lewis et al. 2005). Tabelle 17 zeigt eine Übersicht dieser (möglichen) Ziel-mRNAs der in RAW 264.7 Zellen verifizierten miRNAs. Für die Zuordnung der ermittelten Ziel-mRNAs zu Signalwegen die im Zusammenhang mit einer inflammatorischen Antwort stehen, wurde die Datenbank KEGG Mapper v1.3 (Kanehisa et al. 2012) genutzt.

Tabelle 17 Übersicht der *in silico* ermittelten (potentiellen) miRNA Ziel-mRNAs

ID	Regulation	Ziel-mRNA	Signalweg (KEGG Mapper)	Referenz
miR-146a 5'arm	+	TRAF6	TLR Signalweg	(Taganov et al. 2006)
		IRAK1	TLR Signalweg	(Taganov et al. 2006)
		TAB2	TLR Signalweg	-
miR-146b 5'arm	+	s. miR-146a		
miR-155 5'arm	+	IKKε	TLR Signalweg	(Tili et al. 2007)
		TAB2	TLR Signalweg	(Ceppi et al. 2009)

ID	Regulation	Ziel-mRNA	Signalweg (KEGG Mapper)	Referenz
		MAP3K14	MAPK Signalweg	-
		SOCS1	Jak-Stat Signalweg	(Lu et al. 2009)
		MYB	PI3K-Akt Signalweg	(Imig et al. 2011)
		MAP4K3	JNK und p38 MAPK Signalweg	-
		CASP3	MAPK Signalweg	-
mir-342 5'arm	+	MAP4K4	JNK und p38 MAPK Signalweg	-
		MAP3K7	TLR Signalweg	-
		IL-10	Jak-Stat Signalweg	-
miR-93 5'arm	-	MAP3K8	TLR Signalweg	-
		MAP3K11	JNK und p38 MAPK Signalweg	(Yu et al. 2011)
		MAP3K2	JNK und p38 MAPK Signalweg	-
		MAP3K3	JNK und p38 MAPK Signalweg	-
		MAP3K12	JNK und p38 MAPK Signalweg	-
		MAP3K5	JNK und p38 MAPK Signalweg	-
		MAP3K14	MAPK Signalweg	-
		JAK1	Jak-Stat Signalweg	(Liu et al. 2012)
		STAT3	Jak-Stat Signalweg	(Foshay und Gallicano 2009)
miR-182 5'arm	-	MAP2K1	TLR Signalweg	-
		MAP3K3	JNK und p38 MAPK Signalweg	-
miR-103 3'arm		JAK1	Jak-Stat Signalweg	
		IL13RA1	Jak-Stat Signalweg	-
		MAP3K3	JNK und p38 MAPK Signalweg	-
		TAB3	NF-κB Signalweg	-
		MAP2K4	TLR Signalweg	-
let-7a 5'arm	-	CASP3	MAPK Signalweg	(Tsang und Kwok 2008)
		TAB2	TLR Signalweg	-
		MAP4K4	MAPK Signalweg	(Tan et al. 2015)
		MAP4K3	MAPK Signalweg	(Chen et al. 2014)
		MAP3K1	MAPK Signalweg	-
		MAP3K3	MAPK Signalweg	-
		IL-10	Jak-Stat Signalweg	-
		IL-13	Jak-Stat Signalweg	(Polikepahad et al. 2010)
		IKKε	TLR Signalweg	-
miR-24 3'arm	-	IL1R1	JNK und p38 MAPK Signalweg	-
		MAPK7	JNK und p38 MAPK Signalweg	-
		IL21R	JNK und p38 MAPK Signalweg	-
		p38	JNK und p38 MAPK Signalweg	-

ID	Regulation	Ziel-mRNA	Signalweg (KEGG Mapper)	Referenz
		IL-10	Jak-Stat Signalweg	-
		TLR4	TLR Signalweg	-
		TIRAP	TLR Signalweg	-
		MAPK8IP1	MAPK Signalweg	-
miR-16 5'arm	-	CXCL10	TLR Signalweg	-
		IL10R	Jak-Stat Signalweg	-
		MAP2K4	TLR Signalweg	-
		MAP2K1	TLR Signalweg	(Pan et al. 2014)
		MAP3K4	JNK und p38 MAPK Signalweg	-
		ERK1	MAPK Signalweg	(Hebert et al. 2010)
		MAPK1IP1L	MAPK Signalweg	-
		MAP3K7IP3	MAPK Signalweg	-
		IL6R	Jak-Stat Signalweg	-
miR-15b 5'arm	-	s. miR-16		

Da die Expression von miR-155 nach LPS-Behandlung der RAW 264.7 Zellen 40-fach induziert ist (s. Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3) und aufgrund der *in silico* Vorhersagen neuer, interessanter miR-155 Ziel-mRNAs, wie CASPASE-3 (CASP-3) mRNA (s. Tabelle 17), wurde miR-155 in den folgenden Kapiteln näher analysiert. Die Rolle der LPS-induzierten miR-155 während der inflammatorischen Reaktion in RAW 264.7 Zellen sowie funktionale Mechanismen, die der post-transkriptionalen Regulation (potentieller) Ziel-mRNAs zugrunde liegen, wurden untersucht.

3.4 CASPASE-3 mRNA als potentielle miR-155 Ziel-mRNA

In Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen konnte gezeigt werden, dass miR-155 durch die Zytokine IFN-β und IFN-γ und auch durch LPS induziert wird (Taganov et al. 2006; O'Connell et al. 2007; Ceppi et al. 2009). Ebenso konnten einige inflammatorische Ziel-mRNAs von miR-155 identifiziert werden (s. Abschnitt 1.4.4), wobei häufig der funktionale Mechanismus der miRNA-vermittelten Regulation der mRNA bisher unaufgeklärt blieb (s. Abschnitt 1.4.2).

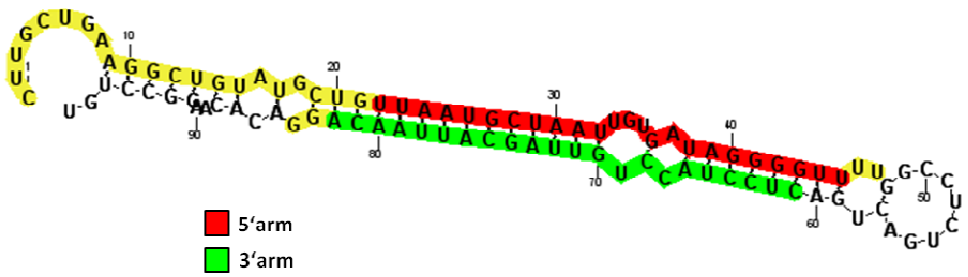

Abbildung 3.5 Struktur der pre-miR-155 nach Prozessierung durch den Drosha-DGCR8 Komplex. Die rote Markierung repräsentiert die spätere reife miR-155 (miR-155 5p), während die grüne Markierung die miR-155 3p darstellt, die im weiteren Verlauf der miRNA Biogenese abgebaut wird.

Interessanterweise konnte durch die *in silico* Vorhersage neben den bereits beschriebenen miR-155 Ziel-mRNAs IKKε und TAB2 (Tili et al. 2007; Ceppi et al. 2009), die für zwei wichtige Proteine des TLR4 Signalwegs kodieren, CASP-3 mRNA als potentielle Ziel-mRNA von miR-155 identifiziert werden (s. Tabelle 17). Ausgelöst durch apoptotische Signalwege wird CASP-3 durch Initiator-Caspasen prozessiert. Die aktive CASP-3 vermittelt durch die proteolytische Spaltung ihrer Substrate Apoptose (s. Abschnitt 1.6) (Han et al. 1997; Porter und Janicke 1999).

Die Bindestellen von miRNAs innerhalb ihrer Ziel-mRNA sind üblicherweise evolutionär konserviert (Bartel 2009). Der Sequenzvergleich verschiedener CASP-3 mRNA 3'UTRs zeigt, dass die Bindestelle für miR-155 in den 3'UTRs verschiedener Säugetierspezies hoch konserviert ist (s. Abbildung 3.6). Dies spricht für eine funktionale Bindestelle.

```
Dog     Casp-3 3'UTR   GAGAGGAAA-TGTTTCTAAATTAACTGCCCTGATAATTAGCAAGTTTTAGTGATGGTGTT 290
Cow     Casp-3 3'UTR   GAGAAGAAAATGACTGTAAATTAGCACTTCTCTTAATTACCAAGATTTAGTGCCGATGCT 295
Mouse   Casp-3 3'UTR   -AGATGAAA----TTACAAAGTTGC-CCTTTTATAATTAGCAAGATTTGG---CGATACT 287
Human   Casp-3 3'UTR   GAGAGGCAA-TGATTGTTAATTTACAGCTTTCATGATTAGCAAGTTACAG---TGATGCT 288
Rat     Casp-3 3'UTR   -AGAAGAAA----TTGGAAAGTCAC-ACTTTGGTAATTAGAGAGATTTGG---TGCCACT 334
                        *** * **     *   ** *  *     *  * ****   ** *   *    *    *
```

Abbildung 3.6 Mittels der Datenbank TargetScan™ (Lewis et al. 2005) konnte CASP-3 als potentielle Ziel-mRNA von miR-155 identifiziert werden. Ein Sequenzvergleich verschiedener CASP-3 3'UTRs zeigt die Konservierung der miR-155 Bindestelle in verschiedenen Säugetierspezies (De Santis et al. 2016). Der Sequenzvergleich wurde mittels ClustalW2 durchgeführt (Larkin et al. 2007).

3.4.1 Untersuchungen zur LPS-Antwort in primären Makrophagen

Um die Abhängigkeit der miR-155 Expression von TLR4 zu untersuchen, wurde zunächst die LPS-Antwort in primären Maus-Makrophagen (*bone-marrow derived macrophages*, BMDM) analysiert. Vorläuferzellen wurden aus dem Knochenmark von C57BL/6 Wildtyp (wt) Mäusen sowie aus TLR4$^{-/-}$-Mäusen präpariert und zu Makrophagen ausdifferenziert. Die TLR4$^{-/-}$-Mäuse wurden dabei freundlicherweise von Prof. Dr. med. Christinan Trautwein (Medizinische Klinik III; UK Aachen) zur Verfügung gestellt und durch Antje Mohs (Medizinische Klinik III; UK Aachen) genotypisiert. Da die LPS-Antwort in BMDM früher erfolgt, wurden die Zellen mit 5 ng/ml LPS (gereinigt aus *S. minnesota*) bis zu 2 h stimuliert (Liepelt et al. 2014) und, analog zu den RAW 264.7 Zellen, zunächst die Aktivierung der Kinasen p38 und ERK 1/2 mittels Western Blot sowie die Expression der Zytokine TNF-α, IL-1β, IL-6 und IL-10 durch qPCR überprüft (s. Abbildung 3.7). Die Phosphorylierung der Kinasen sowie die Expression der Zytokin mRNAs wurden durch Dr. med. Jana Mossanen (Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care, UK Aachen) untersucht.

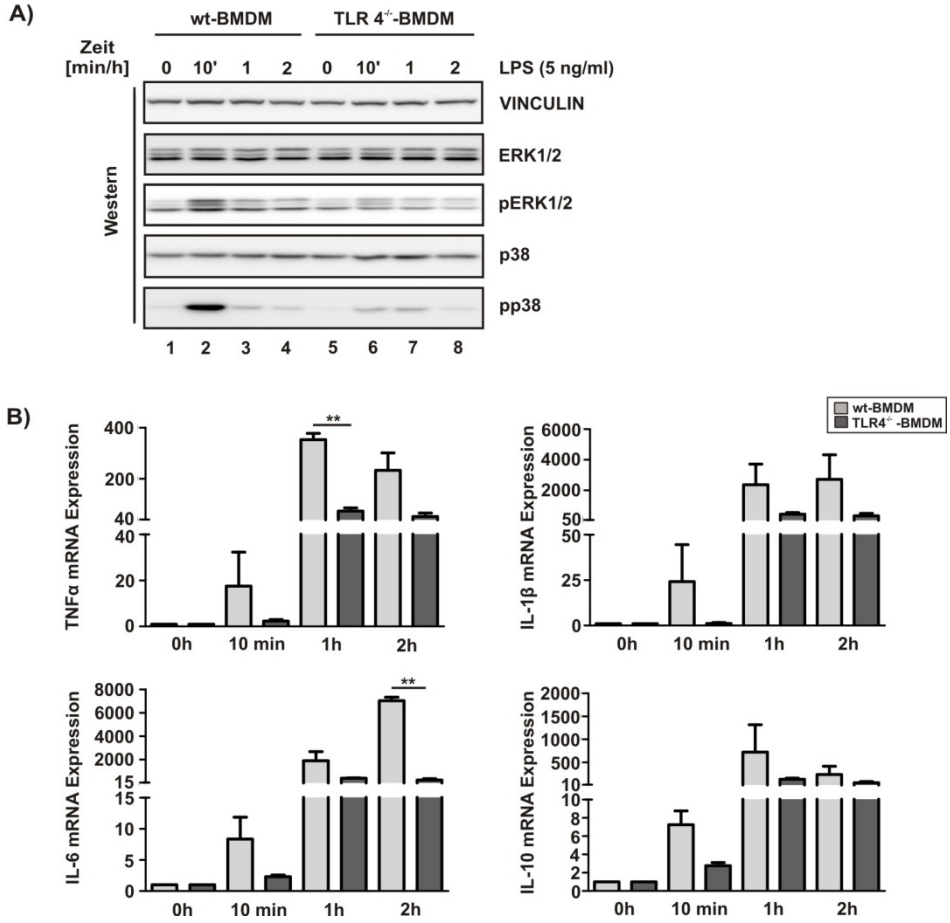

Abbildung 3.7 Analyse der LPS-Antwort in wt-BMDM und TLR4$^{-/-}$-BMDM. BMDM wurden bis zu 2 h mit 5 ng/ml LPS (*S. minnesota*) stimuliert. (A) Die Aktivierung der Kinasen p38 und ERK 1/2 wurde im Western Blot detektiert. VINCULIN diente als Ladekontrolle. (B) Mittels qPCR Analysen wurde die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1β und IL-6 sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in wt- und TLR4$^{-/-}$-BMDM bestimmt. RPS7 diente als endogene Normalisierungskontrolle. (De Santis et al. 2016)

In zytoplasmatischen Extrakten aus TLR4$^{-/-}$-BMDM sind die Signale für phospho-p38 und phospho-ERK 1/2 nach 10-minütiger LPS-Stimulation im Vergleich zu wt-BMDM deutlich schwächer (Abbildung 3.7A, vergleiche Spur 2 und 6). Auch die mRNA Expression der untersuchten Zytokine ist in TLR4$^{-/-}$-BMDM, verglichen mit der Expression in wt-BMDM, deutlich reduziert (s. Abbildung 3.7B).

Im Anschluss wurde die Expression von miR-155 in wt- und TLR4$^{-/-}$-BMDM untersucht, die unbehandelt blieben oder für 2 h mit 5 ng/ml LPS stimuliert wurden. Abbildung 3.8A zeigt, dass die relative miR-155 Expression von ca. 40-fach in wt-BMDM auf weniger als 2-fach in TLR4$^{-/-}$-BMDM sinkt. Dies deutet darauf hin, dass miR-155 in Abhängigkeit von TLR4 induziert wird. Auf die Expression der miR-342, die mittels Hochdurchsatzsequenzierung ebenfalls als hochreguliert identifiziert wurde (s. Abbildung 3.2 links) und die durch Northern Blot und qPCR-Analysen in RAW 264.7 Zellen validiert wurde (s. Abbildung 3.3), hat der *knock out* des Rezeptors keinen Effekt (s. Abbildung 3.8A). Die Analyse des CASP-3 mRNA Levels in diesen Zellen zeigt, dass in wt-

BMDM die Expression von CASP-3 nach 2 h LPS Behandlung reduziert ist (s. Abbildung 3.8B). In den TLR4$^{-/-}$-BMDM dagegen, welche eine stark verminderte miR-155 Expression zeigten, bleibt die Expression von CASP-3 unverändert (Abbildung 3.8B).

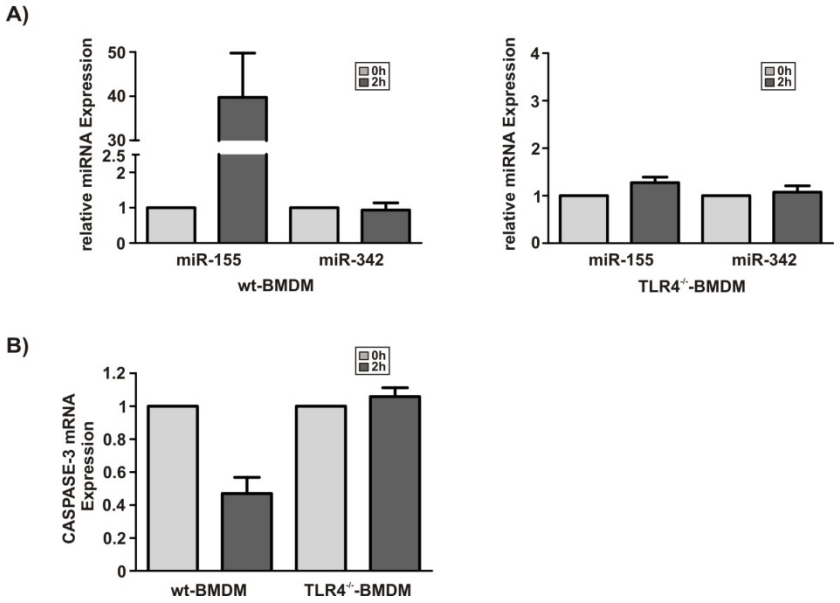

Abbildung 3.8 MiR-155 und CASP-3 mRNA Expression in wt-BMDM und TLR4$^{-/-}$-BMDM. BMDM wurden unbehandelt belassen oder für 2 h mit LPS (*S. minnesota*) aktiviert. (A) Mittels qPCR wurde die Expression von miR-155 und miR-342 gemessen. Als Normalisierungskontrolle diente die endogene U6 snRNA. (B) Die Expression der CASP-3 mRNA wurde durch qPCR analysiert. Also endogene Normalisierungskontrolle wurde NDUFV1 mRNA verwendet. (De Santis et al. 2016)

3.4.2 MiR-155 und CASP-3 mRNA binden an den funktionalen miRISC

Im Zuge der miRNA Biogenese wird die reife miRNA in den zytoplasmatischen *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) integriert, dessen Hauptkomponente in Säugetieren das Protein Ago2 ist (s. Abschnitt 1.4.1) (Huntzinger und Izaurralde 2011; Braun et al. 2013). Um zu untersuchen, ob mögliche miR-155 Ziel-mRNAs spezifisch an einen funktionalen miRISC binden, wurde eine Ago2 Immunopräzipitation durchgeführt. Dabei konnte zunächst im Western Blot die spezifische Präzipitation von Ago2 aus zytoplasmatischen Extrakten von unbehandelten und LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen gezeigt werden (s. Abbildung 3.9A). Als Spezifitätskontrolle diente ein GST-Antikörper. Die RNA wurde aus den Präzipitaten und den *Input*-Proben isoliert und mittels RT-PCR analysiert. Abbildung 3.9B zeigt, dass CASP-3 mRNA mit Ago2, wie auch die bereits bekannten miR-155 Ziel-mRNAs IKKε und TAB2 (Tili et al. 2007; Ceppi et al. 2009), die hier als Positivkontrollen dienten, co-präzipitiert (Abbildung 3.9B, vergleiche Spur 3 und 4). Im Gegensatz dazu co-präzipitiert die als Negativkontrolle verwendete GAPDH mRNA nicht mit Ago2. Es fällt auf, dass die Expression der CASP-3 mRNA nach LPS-Behandlung sowohl in den *Input*-Proben, als auch in den Präzipitaten abnimmt (s. Spur 2 und 4). Hingegen ist die IKKε mRNA in den Makrophagen

nach Aktivierung durch LPS sowohl in den *Input*-Proben als auch in den Präzipitaten deutlich erhöht (s. Spur 2 und 4). Um zu überprüfen, ob miR-155 ebenfalls spezifisch an Ago2 gebunden ist, wurde die miRNA-Menge mittels qPCR gemessen. Nach LPS-Behandlung ist die Assoziation von miR-155 mit Ago2 deutlich verstärkt, wohingegen keine Interaktion in der Kontroll-Immunopräzipitation detektiert werden konnte (Abbildung 3.9C). Die Experimente deuten darauf hin, dass sowohl CASP-3 mRNA, als auch die miR-155 in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen mit Ago2 interagieren.

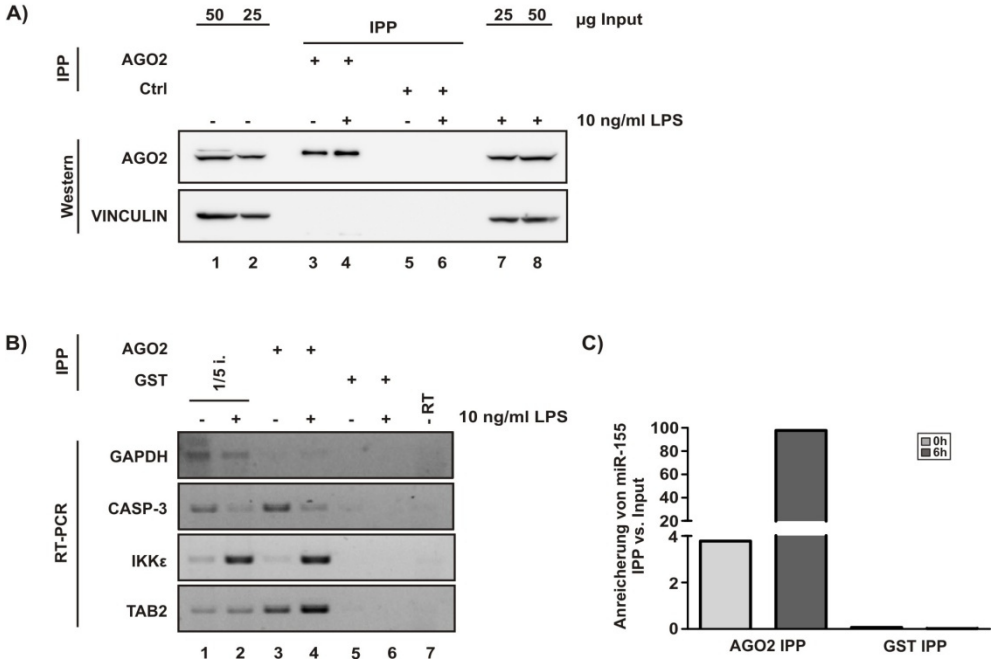

Abbildung 3.9 Die Ago2 Immunopräzipitation aus zytoplasmatischen Extrakten unbehandelter und LPS-aktivierter RAW 264.7 Zellen. (A) Im Western Blot wurde die Immunopräzipitation des Proteins Ago2 aus zytoplasmatischen Extrakten von unbehandelten und LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen detektiert. Als Kontroll-IPP wurde ein unspezifischer GST-Antikörper verwendet. VINCULIN diente als Ladekontrolle für den *Input*. (B) Die co-Präzipitation von CASP-3, IKKε und TAB2 mRNA mit Ago2 wurde mittels RT-PCR analysiert. GAPDH mRNA diente als Negativkontrolle. (C) Durch qPCR Experimente wurde die Assoziation von miR-155 an Ago2 in der IPP im Vergleich zum *Input* gemessen. Als Normalisierungskontrolle diente die exogene miR-39 aus *C elegans*. (De Santis et al. 2016)

3.4.3 Die CASP-3 mRNA Expression ist in LPS-aktivierten Makrophagen reduziert

In einem Experiment zum zeitlichen Verlauf der LPS-Induktion wurde die Expression von miR-155 und CASP-3 mRNA durch qPCR Messungen verfolgt. Zu diesem Zweck wurden RAW 264.7 Zellen bis zu 6 h mit 10 ng/ml LPS stimuliert und die Gesamt-RNA präpariert. Abbildung 3.10 zeigt, dass die zeitabhängige Abnahme der CASP-3 Expression mit dem ansteigenden miR-155 Level in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen korreliert. Die miR-155 Expression bleibt bis ca. 30 min nach LPS-Stimulation unverändert niedrig und wird ab etwa 1 h stark induziert. Gleichzeitig steigt die CASP-

3 mRNA Expression bis ca. 1 h nach Beginn der LPS Stimulation an und nimmt im weiteren Verlauf deutlich ab.

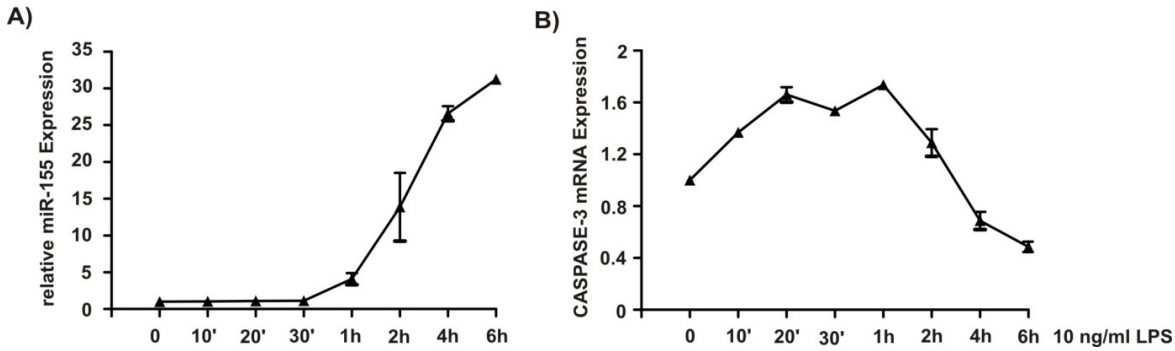

Abbildung 3.10 MiR-155 und CASP-3 mRNA Expression im zeitlichen Verlauf der LPS-Antwort. RAW 264.7 Zellen wurden unbehandelt belassen oder bis zu 6 h mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und die Expression der miR-155 (A) und die CASP-3 mRNA Expression (B) mittels qPCR analysiert. Als endogene Normalisierungskontrollen wurden U6 snRNA und NDUFV1 mRNA verwendet. (De Santis et al. 2016)

Im Anschluss wurde in RAW 264.7 Zellen, die für 6 h mit LPS behandelt wurden, die CASP-3 Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Die CASP-3 mRNA Expression ist in LPS-aktivierten Zellen, im Vergleich zu unbehandelten Makrophagen, signifikant auf ca. 35 % reduziert (s. Abbildung 3.11A, links). Dies stimmt mit der Reduktion der CASP-3 mRNA in der Input-Probe der Ago2 Präzipitation aus zytoplasmatischen Extrakten LPS-aktivierter RAW 264.7 Zellen (s. Abbildung 3.9B) sowie mit der verringerten CASP-3 mRNA Expression in den LPS-behandelten BMDM überein (s. Abbildung 3.8B). Der endogene Level von CASP-3 und gespaltener, aktiver CASP-3 wurde in zytoplasmatischen Extrakten von unbehandelten und LPS-aktivierten Makrophagen durch Western Blot untersucht. Nach LPS-Stimulation ist das Protein um 34 % bzw. 41 % reduziert (s. Abbildung 3.11A, rechts). Da sowohl die CASP-3 mRNA als auch das Protein reduziert sind, kann vermutet werden, dass die CASP-3 mRNA Stabilität während der inflammatorischen Reaktion in RAW 264.7 Zellen abnimmt.

Als Spezifitätskontrolle wurde die IKKε mRNA Expression sowie der IKKε Proteinlevel in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen analysiert. Im Gegensatz zu CASP-3 mRNA, deren Expression nach LPS-Behandlung abnimmt (s. Abbildung 3.11A links), konnte für IKKε mRNA mittels qPCR ein signifikanter, etwa 10-facher Anstieg der Expression detektiert werden (s. Abbildung 3.11B links). Western Blot Analysen zeigten, dass das IKKε Protein in zytoplasmatischem Extrakt aus LPS-behandelten Makrophagen im Vergleich zu unbehandelten Zellen um 45 % abnimmt (s. Abbildung 3.11B rechts). Die Experimente deuten darauf hin, dass miR-155 die IKKε mRNA möglicherweise nicht wie die CASP-3 mRNA destabilisiert, sondern die Translation der IKKε mRNA inhibiert.

Bereits vor einiger Zeit wurde IKKε mRNA als miR-155 Ziel-mRNA identifiziert und validiert (Tili et al. 2007; Lu et al. 2008). Bisherige Untersuchungen konnten jedoch nicht den funktionalen Mechanismus, welcher der miR-155-vermittelten Regulation der IKKε mRNA zugrunde liegt, aufklären (Xiao et al. 2009; Long et al. 2013). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, auf welche Weise miR-155 die IKKε mRNA post-transkriptional reguliert.

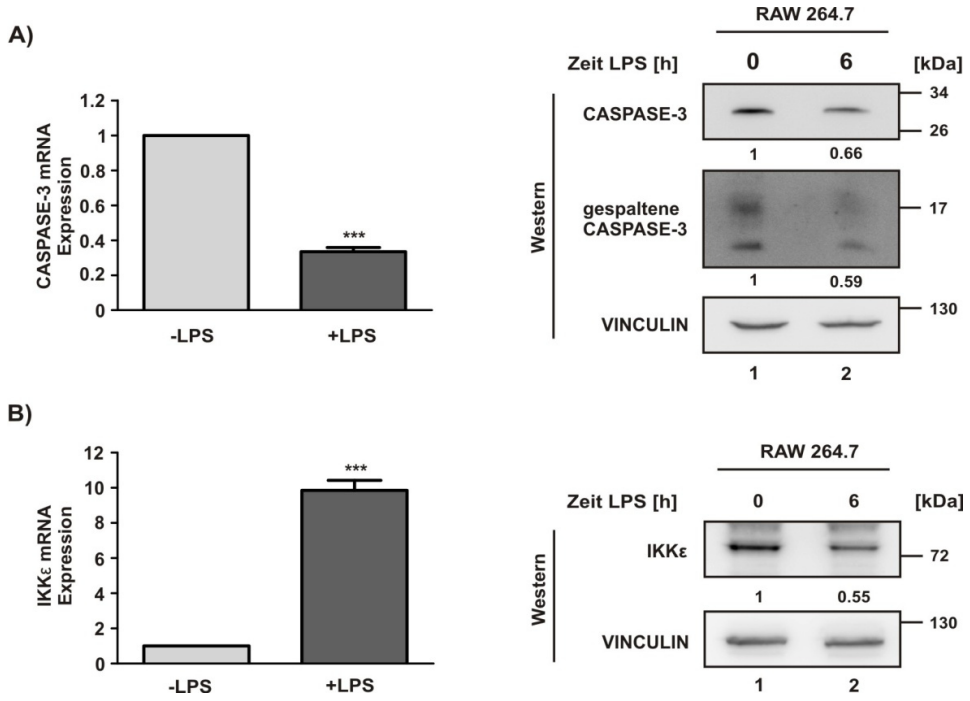

Abbildung 3.11 Analyse der CASP-3 und IKKε Expression in unbehandelten und LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen. Die Expression der CASP-3 (A) und IKKε mRNA (B) wurde durch qPCR gemessen (links). Als endogene Normalisierungskontrolle diente NDUFV1 mRNA. Die endogenen Proteinlevel von CASP-3, der gespaltenen CASP-3 (A) und IKKε (B) in zytoplasmatischen Extrakten der Makrophagen wurde im Western Blot untersucht (rechts). Als Ladekontrolle diente VINCULIN. Die Quantifizierung der jeweiligen Proteinlevel wurde mit MultiGauge (Fujifilm) durchgeführt. (De Santis et al. 2016)

3.4.4 Nach Transfektion von antagomir-155 sind die CASP-3 mRNA Expression und der CASP-3 Proteingehalt erhöht

MiRNAs können durch die Verwendung von 2'-O-methylierten Oligoribonukleotiden gezielt und irreversibel *in vitro* und *in vivo* inhibiert werden (Hutvagner et al. 2004; Meister et al. 2004). Die Bezeichnung *antagomir* wird in der Literatur üblicherweise für einen solchen chemisch hergestellten miRNA-Inhibitor verwendet (Krutzfeldt et al. 2005).

Um den spezifischen Effekt von miR-155 auf die CASP-3 mRNA zu untersuchen, wurden RAW 264.7 Zellen mit einem antagomir gegen die reife miR-155 (antagomir-155) transfiziert. Zur Kontrolle erfolgte die Transfektion der Zellen mit einem antagomir gegen die reife miR-122 (antagomir-122), einer spezifisch in der Leber exprimierten miRNA (Krutzfeldt et al. 2005), die in der durchgeführten Hochdurchsatzsequenzierung nicht nachgewiesen wurde. Die Makrophagen

wurden 42 h nach Transfektion unbehandelt belassen oder für 6 h mit 10 ng/ml LPS bis zur Zellernte aktiviert. Zunächst wurde die LPS-abhängige Induktion der miR-155 in antagomir-122-transfizierten RAW 264.7 Zellen durch qPCR bestätigt. In LPS-aktivierten Makrophagen, die mit antagomir-155 transfiziert wurden, ist die miR-155 dagegen signifikant inhibiert (s. Abbildung 3.12A). In antagomir-122-transfizierten und LPS-induzierten RAW 264.7 Zellen ist der CASP-3 mRNA Level signifikant reduziert. Wurden die mit antagomir-155 transfizierten Makrophagen durch LPS aktiviert, ist dieser Effekt auf die CASP-3 mRNA signifikant verringert (s. Abbildung 3.12B).

Darüber hinaus wurden zytoplasmatische Extrakte aus unbehandelten oder LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen, die zuvor mit antagomir-155 oder antagomir-122 transfiziert wurden, präpariert. Im Western Blot wurde der CASP-3 Proteinlevel in den Extrakten untersucht. In Übereinstimmung mit Abbildung 3.11A (rechts) ist das CASP-3 Protein in LPS-behandelten, antagomir-122-transfizierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf 30 % reduziert. Dieser Effekt ist durch die Transfektion mit antagomir-155 aufgehoben (s. Abbildung 3.12C). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass miR-155 die Translation und/oder die Stabilität der CASP-3 mRNA während der LPS-Antwort in RAW 264.7 Zellen beeinflusst.

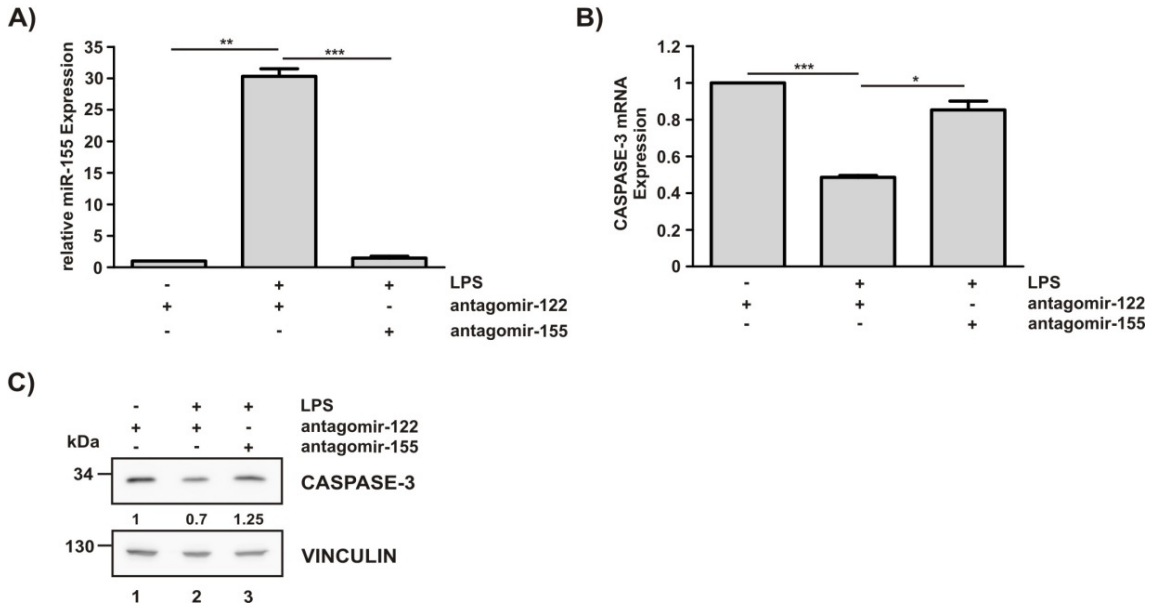

Abbildung 3.12 Antagomir-Transfektion von RAW 264.7 Zellen. Die Makrophagen wurden mit 160 pmol antagomir-155 transfiziert und 48 h später geerntet. Als Kontrolle diente ein antagomir gegen die leberspezifische miR-122. Die RAW 264.7 Zellen wurden unbehandelt belassen oder 6 h vor der Zellernte mit 10 ng/ml LPS stimuliert. (A, B) Die Expression von miR-155 und CASP-3 mRNA in LPS-aktivierten, antagomir-155- oder antagomir-122-transfizierten Zellen wurde mittels qPCR analysiert. U6 snRNA (A) und NDUFV1 mRNA (B) dienten jeweils als endogene Normalisierungskontrollen. (C) Mittels Western Blot wurde die Expression des CASP-3 Proteins in LPS-aktivierten, antagomir-155- oder antagomir-122-transfizierten Zellen detektiert. VINCULIN diente als Ladekontrolle. Die Quantifizierung der Western Blots wurde mit MultiGauge (Fujifilm) durchgeführt. (De Santis et al. 2016)

3.4.5 Die Transfektion eines miR-155 *mimics* inhibiert die Translation der CASP-3 mRNA *in vivo*

Die Ergebnisse der Transfektion der LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen mit antagomir-155 zeigen, dass durch die signifikante Inhibierung der miR-155, CASP-3 mRNA in den Makrophagen zu einem geringeren Maße abnimmt, als in LPS-aktivierten und antagomir-122-transfizierten Zellen (s. Abbildung 3.12B). Umgekehrt wurde im Folgenden der *in vivo* Effekt eines miR-155 *mimics* auf die CASP-3 mRNA in unstimulierten RAW 264.7 Zellen analysiert. Zu diesem Zweck wurden die unbehandelten Makrophagen mit miRNA *mimics* sowie Luciferase Reporter mRNAs co-transfiziert. Als Kontrolle diente, analog zu den antagomir-Transfektionen, ein miR-122 *mimic*. Die Klonierung der Firefly Luciferase (fLUC) Reporter erfolgte in Anlehnung an (Taganov et al. 2006). 466 bp der CASP-3 mRNA 3'UTR, welche die funktionale oder mutierterte (mut) Bindestelle für miR-155 enthält, wurden hinter den offenen Leserahmen (ORF) der fLUC kloniert (s. Abbildung 3.13). Die *in vitro* transkribierten fLUC-CASP-3 Reporter mRNAs trugen ferner eine 5' cap Struktur (m^7GpppG-cap) sowie einen 3' poly(A_{98})-Schwanz. Als interne Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit einer 5' cap *Renilla*-poly(A_{98}) (rLUC) Reporter mRNA co-transfiziert.

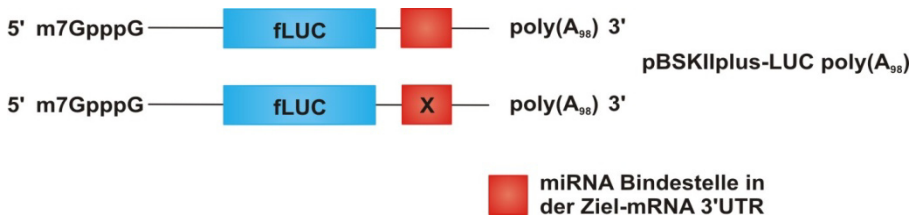

Abbildung 3.13 Schematische Darstellung der klonierten fLUC Reporterkonstrukte. Für die Klonierung wurden ca. 500 bp der jeweiligen Ziel-mRNA 3'UTR mit der miRNA Bindestelle hinter den ORF der Firefly Luciferase fusioniert. Die *in vitro* transkribierten Reporter mRNAs trugen eine 5' cap Struktur und einen 3' poly(A_{98})-Schwanz.

In Anwesenheit des miR-155 *mimics* ist die Translationsaktivität der fLUC-CASP-3 Reporter mRNA mit der funktionalen miR-155 Bindestelle auf 66 % reduziert. Im Vergleich dazu ist die Reporter mRNA, welche die mutierte Bindestelle trägt, in ihrer translationalen Aktivität nicht beeinflusst (s. Abbildung 3.14). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem zuvor in LPS-aktivierten Makrophagen ermitteltem endogenen CASP-3 Protein (vergleiche Abbildung 3.11A mit Abbildung 3.14), in denen miR-155 induziert ist. Die Daten der miRNA-*mimic* Transfektion zeigen, dass die einzelne Bindestelle für miR-155 in der CASP-3 mRNA 3'UTR die miRNA-abhängige Modulation der endogenen CASP-3 in RAW 264.7 Zellen vermittelt.

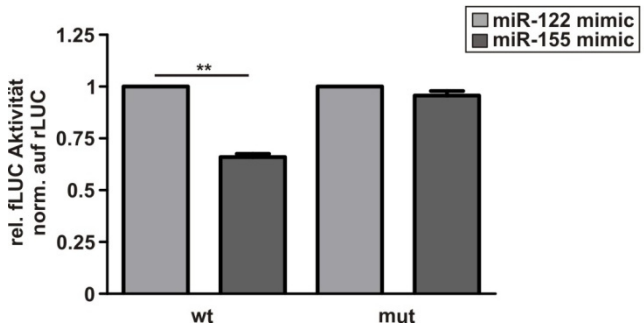

Abbildung 3.14 miRNA-*mimic* Transfektion von RAW 264.7 Zellen. Die Makrophagen wurden mit 1,25 pmol fLUC-CASP-3 Reporter mRNAs mit der Wildtyp (wt) oder mutierten (mut) miR-155 Bindestelle, 0,125 pmol rLUC als interne Normalisierungskontrolle sowie mit 100-fachem Überschuss miR-155 oder miR-122 *mimic* co-transfiziert. Die Translationsaktivität der fLUC Reporter wurde auf rLUC normalisiert. (De Santis et al. 2016)

3.4.6 MiR-155 destabilisiert die CASP-3 mRNA in LPS-aktivierten Makrophagen

Für das grundlegende Verständnis von miRNA-vermittelter Regulation der Genexpression ist die Etablierung eines *in vitro* Translationssystems notwendig. Dies wurde in anderen Zellsystemen bereits gezeigt (Mathonnet et al. 2007; Thermann und Hentze 2007). In dieser Arbeit wurden im Zuge der Etablierung des *in vitro* Systems zunächst in der Literatur beschriebene fLUC-TRAF6 Reporter mRNAs (Taganov et al. 2006) als Positivkontrolle genutzt. Die Expression der inflammatorischen miR-146a wird durch LPS induziert (s. auch Abbildung 3.3) und inhibiert als Teil eines negativen *feedback*-Mechanismus ihre Ziel-mRNAs TRAF6 und IRAK1, die für zwei wesentliche Signalproteine des TLR4-Wegs kodieren (s. Abschnitt 1.4.3). Für die *in vitro* Translation wurden 504 bp der TRAF6 mRNA 3'UTR, welche die zwei natürlich vorkommenden miR-146a Bindestellen beinhalten, hinter den fLUC ORF kloniert. Als Kontrolle wurde eine Reporter mRNA verwendet, in der beide miR-146a Zielsequenzen mutiert waren (s. Abbildung 3.13 und Abbildung 3.15). Die 5' cap fLUC-TRAF6 poly(A_{98}) wt und 5'cap fLUC-TRAF6 poly(A_{98}) mut Reporter mRNAs wurden jeweils mit zytoplasmatischem Extrakt aus LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen inkubiert und die Translationsaktivität nach 30 min gemessen. In Anwesenheit der funktionalen miR-146a Bindestellen ist die Translation der TRAF6 mRNA, im Vergleich zu der fLUC-TRAF6 mut Reporter mRNA, signifikant um ca. 26 % inhibiert (s. Abbildung 3.15B).

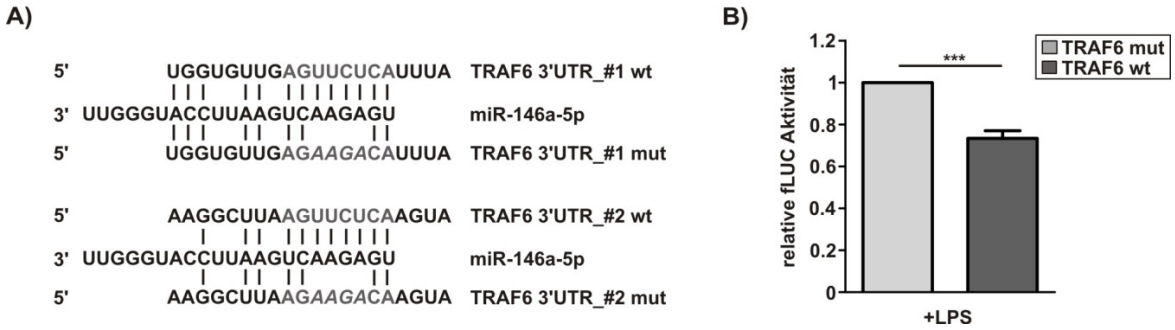

Abbildung 3.15 Die TRAF6 mRNA 3'UTR vermittelt die miR-146a-abhängige Inhibierung der Translation *in vitro*. (A) Sequenzalignment der Wildtyp (wt) oder mutierten (mut) miR-146a Bindestellen in der TRAF6 mRNA 3'UTR. (B) *In vitro* Translation der fLUC-TRAF6 wt und fLUC-TRAF6 mut Reporter mRNAs in zytoplasmatischen Extrakten von LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen.

Der *in vitro* Translationsassay wurde nun genutzt, um den Mechanismus der miR-155-abhängigen Modulation der CASP-3 mRNA und IKKε mRNA zu untersuchen. Um auszuschließen, dass es sich bei dem für miR-146a ermittelten, inhibitorischen Effekt auf die TRAF6 mRNA Translation um einen artifiziellen Effekt handelt (s. Abbildung 3.15B), wurde das bestehende *in vitro* Translationssystem weiterentwickelt. Den Reaktionen wurde jeweils 1/10 5'cap *Renilla* Luciferase (rLUC) poly(A_{98}) als interne Kontrolle hinzugefügt. Zudem wurden die Translationsreaktionen zunächst für 20 min bei 16 °C vorinkubiert, um vor Beginn der mRNA Translation bei 37 °C die Formation der RISC-Komplexe zu erlauben. In anderen Zell-freien Systemen konnte gezeigt werden, dass diese Vorinkubation erforderlich ist, um die Funktion der miRNA zu untersuchen (Mathonnet et al. 2007; Thermann und Hentze 2007).

Für die *in vitro* Translation wurden 5'cap fLUC-CASP-3 poly(A_{98}) Reporter mRNAs mit der funktionalen oder mutierten miR-155 Bindestelle in der mRNA 3'UTR eingesetzt (s. Abbildung 3.17A) und mit zytoplasmatischen Extrakten aus unbehandelten oder LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen inkubiert (s. Abbildung 3.17B). Um die LPS-vermittelte Aktivierung der zur Präparation der zytoplasmatischen Extrakte für die *in vitro* Translation genutzten RAW 264.7 Zellen zu bestätigen, wurde die Expression der TNF-α und IL-10 mRNA sowie der miR-155 überprüft (s. Abbildung 3.16).

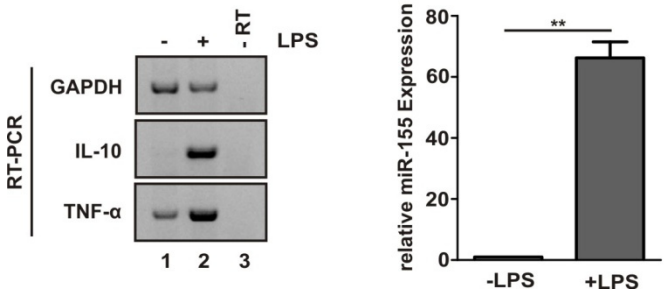

Abbildung 3.16 Überprüfung der LPS-Stimulation in RAW 264.7 Zellen. In zytoplasmatischen Extrakten von unbehandelten und LPS-aktivierten Makrophagen wurde die Expression der Zytokin mRNAs IL-10 und TNF-α mittels RT-PCR überprüft (links). GAPDH mRNA diente als Ladekontrolle Die LPS-abhängige Induktion von miR-155 wurde durch qPCR untersucht (rechts), U6 snRNA diente als endogene Normalisierungskontrolle. (De Santis et al. 2016)

In Extrakten unbehandelter Makrophagen, in denen miR-155 nicht exprimiert wird (s. Abbildung 3.2 links, Abbildung 3.10A und Tabelle Anhang 3), werden die fLUC-CASP-3 Reporter mRNAs mit ähnlicher Effizienz translatiert (s. Abbildung 3.17B links).

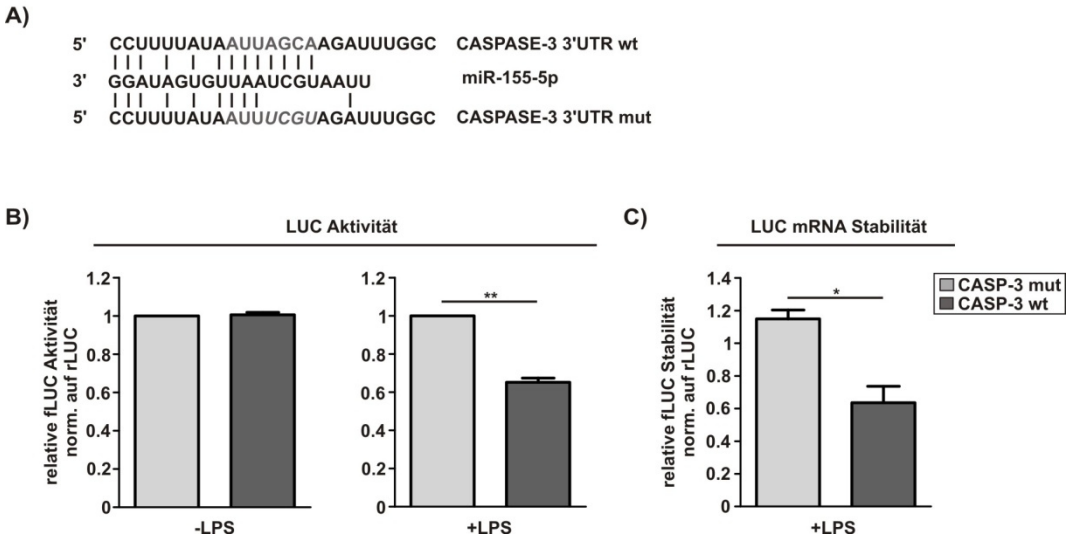

Abbildung 3.17 Die CASP-3 3'UTR vermittelt den miR-155-abhängigen mRNA Abbau *in vitro*. (A) Sequenzalignment der Wildtyp (wt) oder mutierten (mut) miR-155 Bindestelle in der CASP-3 mRNA 3'UTR. (B) *In vitro* Translation der fLUC-CASP-3 wt und fLUC-CASP-3 mut Reporter mRNAs in zytoplasmatischen Extrakten von unbehandelten (links) und LPS-aktivierten (rechts) RAW 264.7 Zellen. Die fLUC Aktivität wurde auf die Translationsaktivität der rLUC Reporter mRNA normalisiert. (C) Die Gesamt-RNA wurde aus den *in vitro* Translationsreaktionen präpariert, CAT mRNA diente als *spike-in* Kontrolle. Die Stabilitäten der fLUC und rLUC mRNAs vor und nach der *in vitro* Translation wurden mittels qPCR bestimmt. Die fLUC Stabilität wurde auf die Stabilität der rLUC Reporter mRNA normalisiert (rechts). (De Santis et al. 2016)

In den zytoplasmatischen Extrakten von LPS-induzierten RAW 264.7 Zellen zeigte sich, dass die Translation der fLUC-CASP-3 Reporter mRNA in Anwesenheit der einzelnen, funktionalen miR-155 Bindestelle signifikant um etwa 35 % reduziert ist (s. Abbildung 3.17B rechts). Eine ähnliche 50 %-ige Inhibierung für Reporter mRNAs mit einer einzelnen miR-2 Bindestelle wurde in einem zellfreiem System in *D. melanogaster* Extrakten gezeigt (Moretti et al. 2012). Diese Ergebnisse

zeigen, dass durch eine Vorinkubation der Translationsreaktionen der Effekt der miRNA-vermittelten Inhibierung der Ziel-mRNA Translation noch deutlicher ausgeprägt ist, was auf eine effiziente Assemblierung der RISC-Komplexe zurückgeführt werden kann.

Um den Einfluss der miR-155 auf die Stabilität der CASP-3 mRNA zu untersuchen, wurde der Anteil der fLUC-CASP-3 mRNA vor und nach der Translationsreaktion bestimmt. Die relative Stabilität der fLUC-CASP-3 mRNA ist in Anwesenheit der miR-155 wt Bindestelle signifikant reduziert (s. Abbildung 3.17C). Im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen (s. Abbildung 3.11), weist dies deutlich darauf hin, dass die miR-155-vermittelte Modulation der CASP-3 Synthese durch die Destabilisierung der CASP-3 mRNA erfolgt.

In vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen die IKKε mRNA induziert wird, während der IKKε Proteinlevel reduziert ist (s. Abbildung 3.11B). Zur Überprüfung der Hypothese, dass miR-155 die translationale Inhibierung der IKKε mRNA vermittelt, wurden 5' cap fLUC poly(A_{98}) Reporter mRNAs die 464 bp der IKKε mRNA 3'UTR mit der funktionalen oder mutierten miR-155 Bindestelle trugen (s. Abbildung 3.18A) mittels des beschriebenen *in vitro* Translationssystem analysiert. Wie für CASP-3 wurde den Translationsreaktionen als interne Kontrolle jeweils 1/10 5'cap rLUC poly(A_{98}) hinzugefügt und die Reaktionen vor der Translation mit den zytoplasmatischen Extrakten von unbehandelten und LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen vorinkubiert.

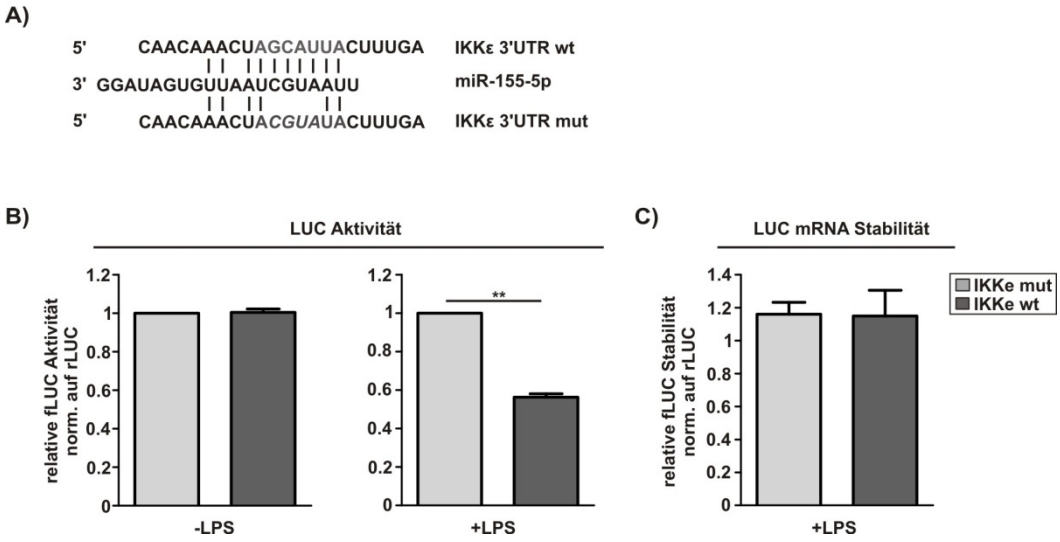

Abbildung 3.18 Die IKKε 3'UTR vermittelt die miR-155-abhängige Inhibierung der mRNA Translation *in vitro*. (A) Sequenzalignment der Wildtyp (wt) oder mutierten (mut) miR-155 Bindestelle in der IKKε mRNA 3'UTR. (B) *In vitro* Translation der fLUC-IKKε wt und fLUC-IKKε mut Reporter mRNAs in zytoplasmatischen Extrakten von unbehandelten (links) und LPS-aktivierten (rechts) RAW 264.7 Zellen. Die fLUC Aktivität wurde auf die Translationsaktivität der rLUC Reporter mRNA normalisiert. (C) Die Gesamt-RNA wurde aus den *in vitro* Translationsreaktionen präpariert, CAT mRNA diente als *spike-in* Kontrolle. Die Stabilitäten der fLUC und rLUC mRNAs vor und nach der *in vitro* Translation wurden mittels qPCR bestimmt. Die fLUC Stabilität wurde auf die Stabilität der rLUC Reporter mRNA normalisiert. (De Santis et al. 2016)

Wie bereits zuvor beobachtet, ist die Translationseffizienz der fLUC-IKKε wt und fLUC-IKKε mut Reporter mRNAs in zytoplasmatischen Extrakten unbehandelter RAW 264.7 Zellen vergleichbar (s. Abbildung 3.18B links). In Extrakten LPS-aktivierter Makrophagen, in denen die Expression der miR-155 hochreguliert ist, ist die Translation der fLUC-IKKε wt Reporter mRNA im Vergleich zu dem Konstrukt mit der mutierten miR-155 Bindestelle signifikant um 44 % reduziert. Dies entspricht den Ergebnissen der endogenen IKKε Expression in LPS-behandelten RAW 264.7 Zellen (vergleiche Abbildung 3.18B rechts mit Abbildung 3.11B). Die Stabilität der IKKε mRNA ist durch die LPS-induzierte miR-155, anders als die CASP-3 mRNA (s. Abbildung 3.17C), jedoch nicht beeinflusst. Die relative Stabilität der fLUC-IKKε Reporter mRNAs mit der wt oder der mutierten miR-155 Zielsequenz zeigt keine Unterschiede (s. Abbildung 3.18C), was die miR-155 vermittelte translationale Inhibierung der IKKε mRNA verdeutlicht.

3.4.7 Analyse der anti-apoptotischen Funktion der LPS-induzierten miR-155 in Makrophagen

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen die Expression der miR-155 induziert und infolgedessen die Stabilität der CASP-3 mRNA verringert ist. Da die Protease CASP-3 eine wichtige Rolle in der Apoptose spielt, wurde im Folgenden eine protektive Funktion der LPS-induzierten miR-155 während der inflammatorischen Antwort in Makrophagen untersucht. Um in RAW 264.7 Zellen Apoptose auszulösen, wurde das bakterielle Alkaloid Staurosporin (SSP) genutzt, da in Osteoblasten gezeigt werden konnte, dass SSP den Zelltod durch CASP-3 Aktivierung induzieren kann (Chae et al. 2000).

RAW 264.7 Zellen blieben entweder unstimuliert oder wurden mit 10 ng/ml LPS für 30 min vorinkubiert, gefolgt von einer sechsstündigen Behandlung mit 500 nM SSP (s. Abbildung 3.19).



Abbildung 3.19 Schematische Darstellung der SSP-Behandlung. RAW 264.7 Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 30 min mit 10 ng/ml LPS vorinkubiert. Nach einer sechsstündigen Behandlung mit 500 nM SSP wurden die Zellen für die Präparation von Gesamt-RNA und zytoplasmatischer Extrakte geerntet.

Zunächst wurde die Expression von miR-155 und CASP-3 mRNA in RAW 264.7 Zellen analysiert. Im Vergleich zu unbehandelten RAW 264.7 Zellen, resultiert die LPS-Behandlung der Zellen in einem 50-fachen Anstieg der miR-155 und einer signifikanten Abnahme der CASP-3 mRNA (s. Abbildung 3.20). In SSP-behandelten Makrophagen ist die miR-155 Expression inhibiert und der CASP-3

mRNA-Gehalt erhöht. In RAW 264.7 Zellen die vor der SSP-Behandlung mit LPS inkubiert wurden, ist die miR-155 ca. 17-fach hochreguliert, während der CASP-3 mRNA Gehalt, im Vergleich zu den Zellen die nur mit SSP behandelt wurden, abnimmt (s. Abbildung 3.20).

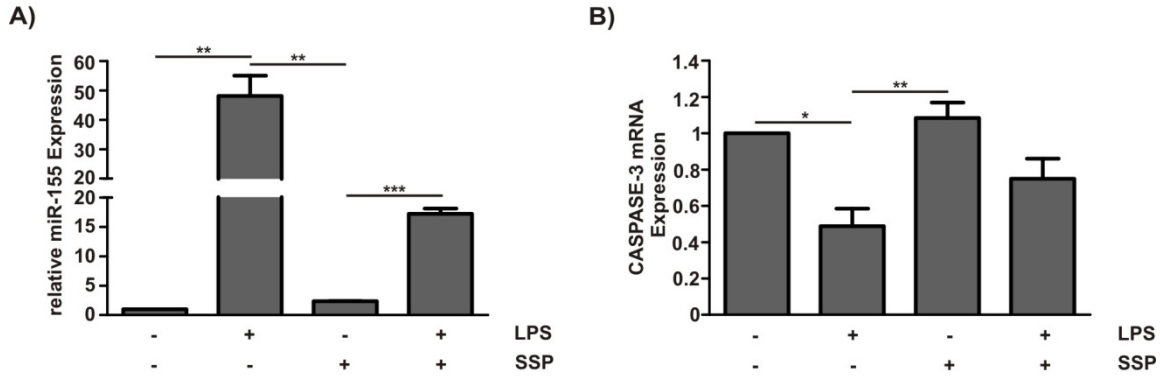

Abbildung 3.20 Analyse der miR-155 und der CASP-3 mRNA Expression in SSP-behandelten RAW 264.7 Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 30 min mit 10 ng/ml LPS vorinkubiert, gefolgt von einer Behandlung mit 500 nM SSP für 6 h. Die Messung der miR-155 Expression (A) und der CASP-3 mRNA Level (B) erfolgte mittels qPCR. Als endogene Normalisierungskontrolle diente U6 snRNA (A) bzw. NDUFV1 mRNA (B).

Die zytoplasmatischen Extrakte der wie oben beschriebenen behandelten RAW 264.7 Zellen wurden im Western Blot untersucht (Abbildung 3.21). Wie zuvor beobachtet (s. Abbildung 3.11A rechts), ist CASP-3 Protein nach LPS-Behandlung der Zellen reduziert (s. Abbildung 3.21, Spur 2). In Zellen die nur mit SSP-behandelt wurden, sinkt der CASP-3 Proteingehalt weiter ab (Spur 3), während in RAW 264.7 Zellen, die vor der SSP-Behandlung mit LPS inkubiert wurden, der CASP-3 Level ansteigt (Spur 4). PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1) ist ein Substrat der gespaltenen, aktiven CASP-3, das durch DNA-Strangbrüche aktiviert wird (s. Abschnitt 1.6) (Soldani und Scovassi 2002). Aus diesem Grund wurde die Spaltung von PARP-1 als *read out* für die Apoptose der RAW 264.7 Zellen genutzt. In Makrophagen die ausschließlich mit SSP behandelt wurden, ist das ca. 85 kDa große PARP-1 Spaltprodukt deutlich detektierbar (Abbildung 3.21, Spur 3), während es in den Zellen die mit LPS vorbehandelt wurden, stark reduziert ist. Gleichzeitig ist hier nicht gespaltenes PARP-1 erhöht (Spur 4).

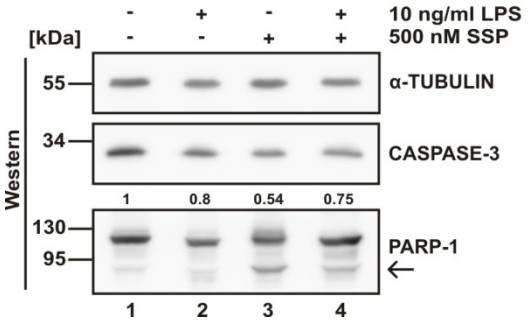

Abbildung 3.21 Analyse der zytoplasmatischen Extrakte von SSP-behandelten RAW 264.7 Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 30 min mit 10 ng/ml LPS vorinkubiert, gefolgt von einer Behandlung mit 500 nM SSP für 6 h. Die Analyse der CASP-3 und PARP-1 Proteinlevel erfolgte mittels Western Blot. Als Ladekontrolle diente α-TUBULIN. Die Quantifizierung des CASP-3 Proteins wurde mit MultiGauge (Fujifilm) durchgeführt.

In den zytoplasmatischen Extrakten wurde ferner die enzymatische Aktivität von CASP-3 untersucht. In Extrakten von unbehandelten und LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen war die CASP-3-Aktivität nicht verändert. Der Anstieg der CASP-3 Aktivität in zytoplasmatischen Extrakten SSP-behandelter RAW 264.7 Zellen ist, wenn eine Vorinkubation mit LPS erfolgte, stark reduziert (s. Abbildung 3.22).

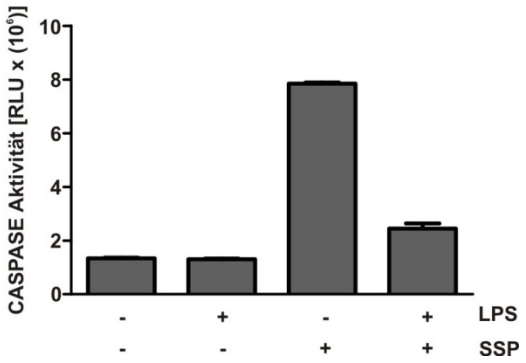

Abbildung 3.22 Analyse der CASP-3 Aktivität in zytoplasmatischen Extrakten von SSP-behandelten RAW 264.7 Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 30 min mit 10 ng/ml LPS vorinkubiert, gefolgt von einer Behandlung mit 500 nM SSP für 6 h. 12,5 µg der Extrakte wurden in den Aktivitätsassay eingesetzt. (De Santis et al. 2016)

Um in den Makrophagen Apoptosevorgänge zu untersuchen, wurden RAW 264.7 Zellen mit Annexin V-APC und 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. In apoptotischen Zellen wird das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Seite der Zellmembran transloziert, wodurch es gegenüber dem extrazellulären Milieu exponiert wird. Annexin V bindet das exponierte PS mit hoher Affinität und kann, konjugiert mit dem Fluorochrom APC, zur sensitiven Detektion apoptotischer Zellen in der Durchflusszytometrie genutzt werden (Schmid et al. 1992; Vermes et al. 1995). Die co-Färbung mit dem Vitalfarbstoff 7-AAD erlaubt die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Die

durchflusszytometrischen Analysen wurden mit Unterstützung von Dr. Anke Liepelt (Medizinische Klinik III, UK Aachen) und Dr. med. Jana Mossanen (Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care, UK Aachen) durchgeführt. Die Experimente zeigen zunächst, dass der prozentuale Anteil Annexin V positiver Zellen in LPS-stimulierten Makrophagen im Vergleich zu unbehandelten Zellen leicht abnimmt (s. Abbildung 3.23). In RAW 264.7 Zellen, die nur mit SSP behandelt wurden, steigt der Anteil der Annexin V positiver Zellen auf etwa 8 %, während dieser Anstieg bei Vorinkubation mit LPS auf ca. 2 % reduziert ist (s. Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24).

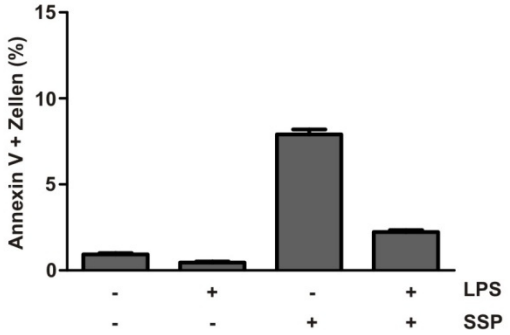

Abbildung 3.23 Übersicht der Annexin V positiven RAW 264.7 Zellen. Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 30 min mit 10 ng/ml LPS vorinkubiert, gefolgt von einer Behandlung mit 500 nM SSP für 6 h. Im Anschluss wurden die Zellen mit Annexin V-APC und 7-AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Annexin V positiven Zellen aller lebenden Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Daten wurden mittels FlowLogic ausgewertet. (De Santis et al. 2016)

Zusammengefasst konnte festgestellt werden, dass die miR-155 Expression in SSP-behandelten RAW 264.7 Zellen nicht induziert wird und ein höherer CASP-3 mRNA-Gehalt detektiert werden kann. Darüber hinaus ist in den Extrakten dieser Zellen eine Spaltung des CASP-3 Substrates PARP-1 sowie eine hohe CASP-3 Aktivität zu verzeichnen. Außerdem konnte unter den SSP-behandelten RAW 264.7 Zellen der größte prozentuale Anteil der Annexin V positiven Zellen detektiert werden. In Makrophagen, die zuvor mit LPS vorinkubiert wurden, ist die miR-155 Expression induziert und die CASP-3 mRNA reduziert. Gleichzeitig ist die Spaltung von PARP-1, die Aktivität der CASP-3 und der prozentuale Anteil der Annexin V positiven Zellen verringert.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die LPS-induzierte miR-155 den Eintritt der RAW 264.7 Zellen in den durch SSP-ausgelösten apoptotischen Zelltod unterbinden könnte. Dies geschieht vermutlich durch die Destabilisierung der CASP-3 mRNA (s. Abschnitt 3.4.6).

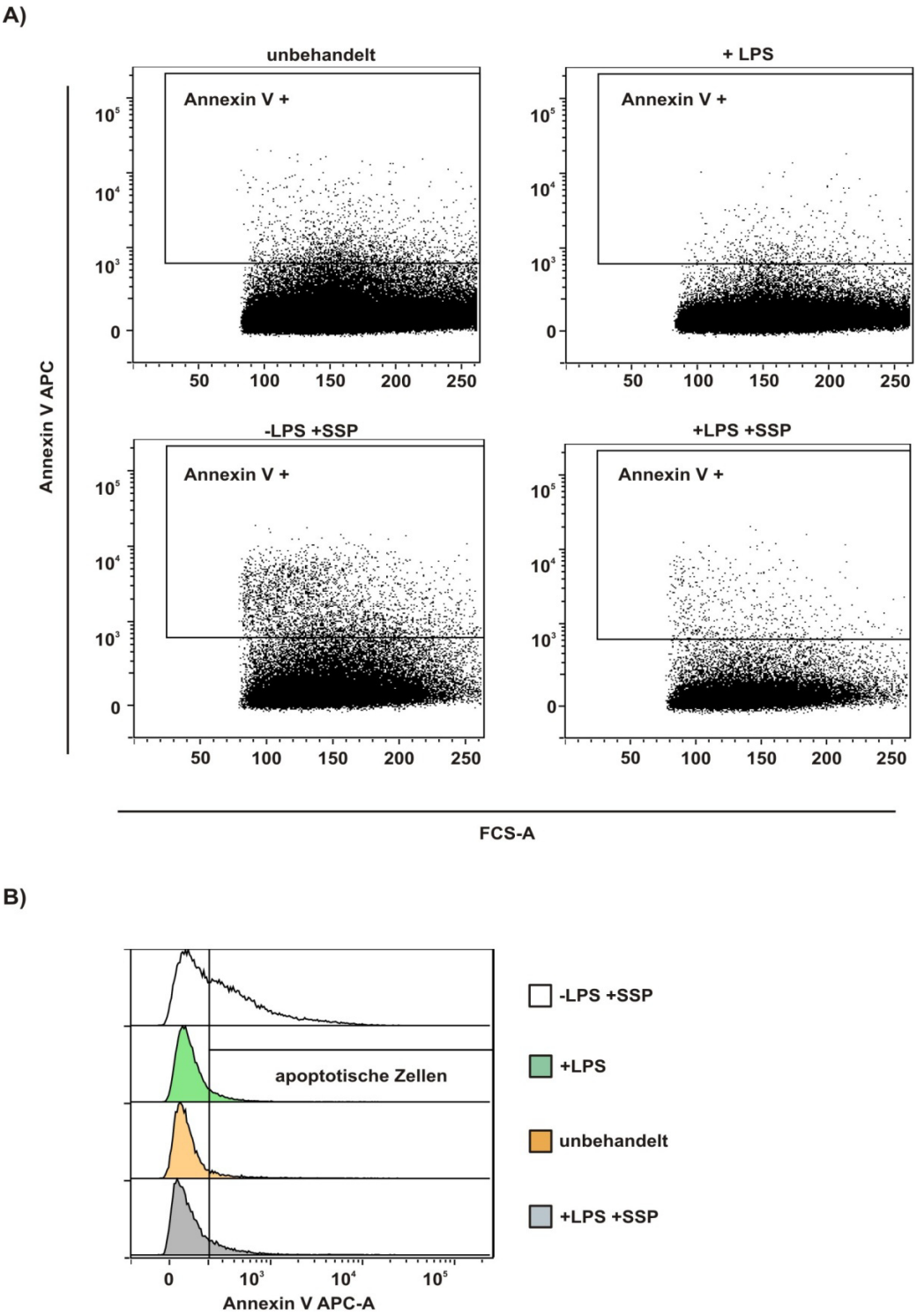

Abbildung 3.24 Durchflusszytometrische Analyse nach SSP-induzierter Apoptose. RAW 264.7 Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 30 min mit 10 ng/ml LPS vorinkubiert, gefolgt von einer Behandlung mit 500 nM SSP für 6 h. Die Makrophagen wurden mit Annexin V-APC und 7-AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Einzelne und lebende Zellen wurden vorselektiert und die Intensität des Annexin V-APC Signals in Dot Plots (A) und Histogrammen (B) dargestellt. (De Santis et al. 2016)

Im nächsten Schritt wurde der spezifische Effekt von miR-155 auf die SSP-induzierte Apoptose in RAW 264.7 Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit dem antagomir-155 oder mit dem als Kontrolle dienenden antagomir-122 transfiziert (s. Abbildung 3.25).

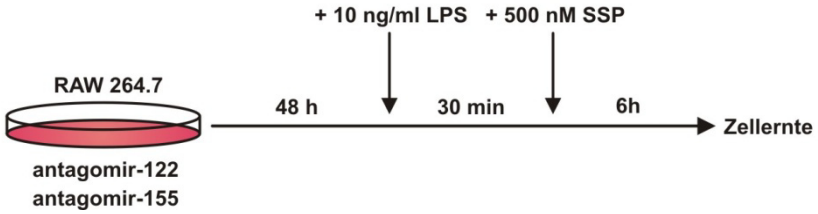

Abbildung 3.25 Schematische Darstellung der antagomir-Transfektion und SSP-Behandlung der RAW 264.7 Zellen. Die Makrophagen wurden mit 160 pmol antagomir-155 oder antagomir-122 als Kontrolle transfiziert und 48 h später geerntet. Vor der Ernte wurden die Zellen unbehandelt belassen oder für 30 min mit 10 ng/ml LPS vorinkubiert, gefolgt von einer sechsstündigen Behandlung mit 500 nM SSP.

Wie zuvor beobachtet, zeigt die Analyse der miR-155 und CASP-3 mRNA Expression einen signifikanten Anstieg der miRNA (s. Abbildung 3.26A) und eine Abnahme der CASP-3 mRNA (s. Abbildung 3.26B) in LPS-aktivierten und antagomir-122 transfizierten Zellen.

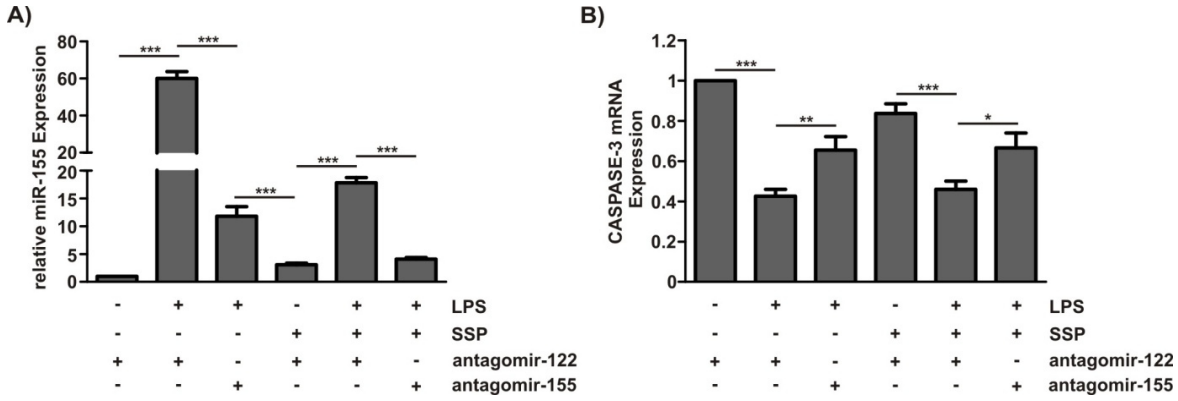

Abbildung 3.26 Analyse der miR-155 und der CASP-3 mRNA Expression in antagomir-transfizierten, SSP-behandelten RAW 264.7 Zellen. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit 160 pmol antagomir-155 oder -122 geerntet. Wenn angegeben, wurden die RAW 264.7 Zellen mit 10 ng/ml LPS für 30 min vorinkubiert, gefolgt von einer sechstündigen SSP-Behandlung. Die Expression der miR-155 (A) und CASP-3 mRNA (B) wurden durch qPCR ermittelt. Als Normalisierungskontrolle wurden U6 snRNA (A) und NDUFV1 mRNA (B) genutzt. (De Santis et al. 2016)

Nach Transfektion von antagomir-155 ist die miR-155 inhibiert, während die CASP-3 mRNA stabilisiert wird. Entsprechend Abbildung 3.21 wird miR-155 in antagomir-122-transfizierten Zellen, die mit SSP behandelt wurden, inhibiert und der CASP-3 mRNA Gehalt ist nicht verringert. In LPS- und SSP-behandelten RAW 264.7 Zellen, die mit antagomir-122 transfiziert wurden, weist miR-155 eine ca. 19-fache Zunahme auf und CASP-3 mRNA nimmt ab (s. Abbildung 3.26). In RAW 264.7 Zellen die mit LPS und SSP behandelt wurden, jedoch mit antagomir-155 transfiziert

wurden, sinkt die miR-155 Expression auf ca. 4-fach ab und der CASP-3 mRNA Gehalt ist erhöht (s. Abbildung 3.26).

Die Untersuchung der CASP-3 Aktivität in zytoplasmatischen Extrakten aus LPS-aktivierten, antagomir-122-transfizierten RAW 264.7 Zellen zeigt in Übereinstimmung mit Abbildung 3.22 eine Abnahme der enzymatischen CASP-3 Aktivität im Vergleich zu unbehandelten antagomir-122 transfizierten Makrophagen (s. Abbildung 3.27). Die CASP-3 Aktivität ist in LPS-aktivierten Zellen, die mit antagomir-155 transfiziert wurden, hingegen signifikant erhöht. Die höchste Aktivität der Protease ist in RAW 264.7 Zellen zu beobachten, die mit antagomir-122-transfiziert und SSP behandelt wurden. Im Vergleich dazu und im Einklang mit vorherigen Experimenten (s. Abbildung 3.22), ist die CASP-3-Aktivität signifikant reduziert, wenn die antagomir-122-transfizierten Zellen zuvor mit LPS stimuliert wurden. Interessanterweise steigt die CASP-3 Aktivität in zytoplasmatischen Extrakten aus LPS- und SSP-behandelten RAW 264.7 Zellen die mit antagomir-155 transfiziert wurden signifikant an, verglichen mit antagomir-122-transfizierten Makrophagen (s. Abbildung 3.27).

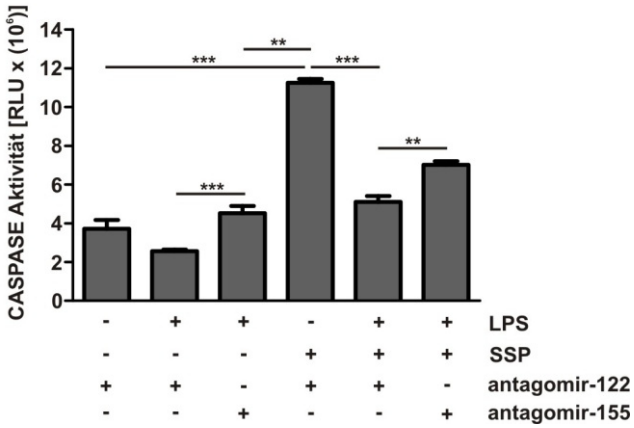

Abbildung 3.27 Analyse der CASP-3 Aktivität in zytoplasmatischen Extrakten aus antagomir-transfizierten, SSP-behandelten RAW 264.7 Zellen. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit 160 pmol antagomir-155 oder -122 geerntet. Wenn angegeben, wurden die RAW 264.7 Zellen mit 10 ng/ml LPS für 30 min vorinkubiert, gefolgt von einer sechstündigen SSP-Behandlung. 12,5 µg der Extrakte wurden in den Aktivitätsassay eingesetzt. (De Santis et al. 2016)

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der antagomir-transfizierten, SSP-behandelten RAW 264.7 Zellen stehen im Einklang mit den zuvor ermittelten Resultaten (vergleiche Abbildung 3.28 mit Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24). In antagomir-122 transfizierten, LPS-aktivierten Makrophagen ist der prozentuale Anteil der Annexin V positiven Zellen, verglichen mit unbehandelten, transfizierten Zellen, leicht verringert. Wurden RAW 264.7 Zellen stattdessen mit antagomir-155 transfiziert und mit LPS behandelt, steigt der Anteil der Annexin V positiven Zellen an (s. Abbildung 3.28).

Der höchste Anteil der der Annexin V positiven Zellen wurde in den antagomir-122-transfizierten Makrophagen detektiert, in denen durch SSP Apoptose induziert wurde. Eine signifikante Abnahme der Annexin V positiven Zellen konnte dagegen in den RAW 264.7 Zellen beobachtet werden, die mit antagomir-122 transfiziert und vor der SSP-Behandlung mit LPS aktiviert wurden (s. Abbildung 3.28). Interessanterweise steigt der prozentuale Anteil der Annexin V positiven Zellen, wenn RAW 264.7 Zellen mit antagomir-155 transfiziert wurden (s. Abbildung 3.28).

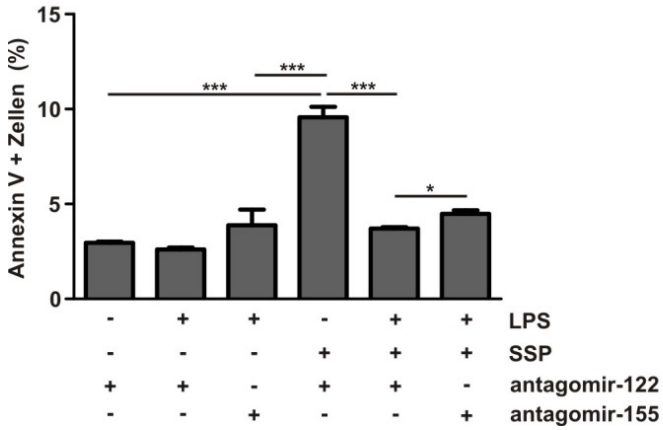

Abbildung 3.28 Übersicht der Annexin V positiven Zellen in antagomir-transfizierten, SSP-behandelten RAW 264.7 Zellen. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit 160 pmol antagomir-155 oder -122 geerntet. Wenn angegeben, wurden die RAW 264.7 Zellen mit 10 ng/ml LPS für 30 min vorinkubiert, gefolgt von einer sechstündigen SSP-Behandlung. Im Anschluss wurden die Zellen mit Annexin V-APC und 7-AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Annexin V positiven Zellen aller lebenden Zellen. Die Daten wurden mittels FlowJo ausgewertet. (De Santis et al. 2016)

Aus diesen Ergebnissen lässt sich zusammenfassend schlussfolgern, dass die LPS-induzierte miR-155 in RAW 264.7 Zellen tatsächlich den durch SSP ausgelösten Eintritt in die Apoptose vermindert (s. Abbildung 3.29). In LPS- und SSP-behandelten Makrophagen, in denen durch die antagomir-Transfektion die miR-155 Expression inhibiert wurde, ist CASP-3 mRNA, im Vergleich zu gleich behandelten, jedoch mit antagomir-122-transfizierten Zellen, erhöht. Ferner sind die CASP-3 Aktivität und der prozentuale Anteil der Annexin V positiven Zellen in antagomir-155-transfizierten RAW 264.7 Zellen signifikant höher.

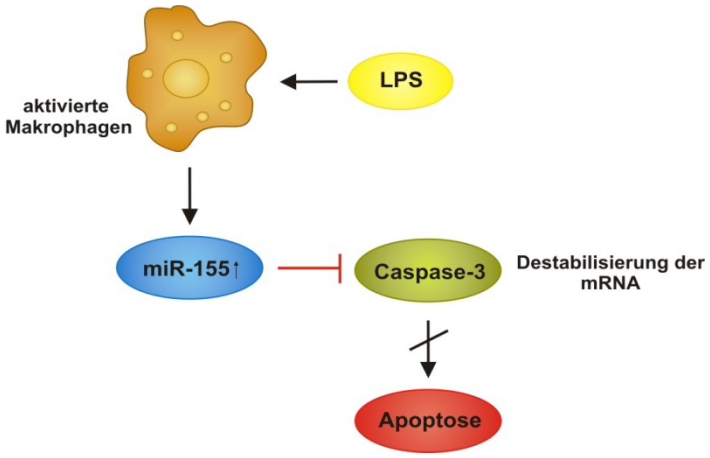

Abbildung 3.29 Modell zur protektiven Funktion der LPS-induzierten miR-155 in der Maus-Makrophagen Zelllinie RAW 264.7. Durch die LPS Stimulation wird in den RAW 264.7 Zellen die Expression von miR-155 induziert. Durch die miR-155 vermittelte Destabilisierung der CASP-3 mRNA wird in den Makrophagen Apoptose verhindert.

3.5 Isolierung von zirkulierenden miRNAs aus humanem Serum

Zirkulierende miRNAs gewinnen zunehmend an Bedeutung, da sie sich aufgrund ihrer differentiellen Expression als potentielle diagnostische Marker für eine Vielzahl von Krankheitsbildern eignen und möglichweise verschiedene, regulatorische Funktionen in Zielzellen ausüben (Ma et al. 2013). Auch im Serum und Plasma von Patienten, die an SIRS oder einer Sepsis leiden, sind einige zirkulierender miRNAs differentiell exprimiert. In der Literatur werden kontroverse Meinungen hinsichtlich der Standardisierung der Protokolle für die Extraktion der RNA und der miRNA Analyse mittels qPCR vertreten (Benz et al. 2013; Roberts et al. 2014). Dies macht eine Beurteilung der unterschiedlichen, veröffentlichten Studien zur Identifizierung von miRNAs, die sich als mögliche Biomarker für SIRS und Sepsis eignen, schwierig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vorexperimente zur Isolierung von zirkulierenden miRNAs aus humanem Serum durchgeführt. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit und anhand von Literaturdaten zu zirkulierenden miRNAs wurden die miRNAs miR-150 (Vasilescu et al. 2009), miR-146a (diese Arbeit, (Wang et al. 2010)), miR-4772-5p-iso (Ma et al. 2013), miR-223 (Wang et al. 2010) und miR-574-5p (Wang et al. 2012a) für die Analyse genutzt. Dazu wurden zunächst miRNAs mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits aus dem Serum von freiwilligen, gesunden Probanden präpariert und mittels qPCR detektiert (s. Abbildung 3.30).

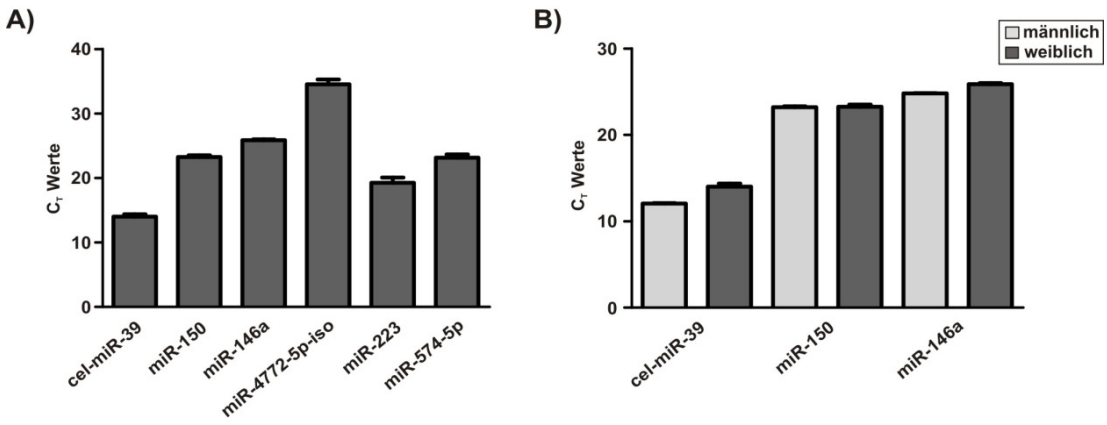

Abbildung 3.30 Isolierung von zirkulierenden miRNAs aus dem Serum gesunder Probanden. Mittels qPCR wurde die Expression spezifischer, zirkulierender miRNAs detektiert. Dargestellt sind die C_T Werte der untersuchten miRNAs im Serum von zwei gesunden, weiblichen Probanden (A) sowie die C_T Werte von miR-150, miR-146a und der *spike-in* Kontrolle cel-miR-39 im Serum von drei gesunden männlichen Probanden im Vergleich zu den zwei weiblichen Probanden (B).

Der C_T (*cycle threshold*) Wert der untersuchten miRNAs beschreibt den Zyklus der qPCR in dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt (Schefe et al. 2006). Je niedriger ein C_T Wert ist, desto größer ist die Kopienzahl der untersuchten miRNA in der jeweiligen Serumprobe. Im Serum von weiblichen, gesunden Freiwilligen konnten alle

untersuchten miRNAs sowie die *spike-in* Kontrolle aus *C. elegans* (cel-miR-39) detektiert werden, wobei die unterschiedliche Abundanz der miRNAs deutlich wird (s. Abbildung 3.30A).

Im nächsten Schritt wurde die Anzahl der untersuchten miRNAs reduziert und die C_T-Werte der extrazellulären miR-150 (Roderburg et al. 2013) und miR-146a (Wang et al. 2010) sowie der cel-miR-39 als Kontrolle im Serum von weiblichen und männlichen, gesunden Freiwilligen verglichen (s. Abbildung 3.30B). Die initalen qPCR Analysen machen deutlich, dass es scheinbar keine geschlechterspezifischen Unterschiede in der Abundanz der untersuchten miRNAs gibt.

In einem ersten Experiment wurde die Expression von miR-150 und miR-146a im Serum eines männlichen SIRS Patienten (1 Tag post-OP) und eines männlichen septischen Patienten am Tag der Sepsis-Diagnose (Tag Aufnahme, T_A) und am Tag 3 (T_3) nach Diagnose mittels qPCR untersucht (s. Abbildung 3.31). Die Proben wurden dabei freundlicherweise von PD Dr. med. Tobias Schürholz (Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care, UK Aachen) zur Verfügung gestellt, welche im Rahmen des Projektes *Adrenosep* entnommen wurden. Die Expression von miR-150 ist im Serum des SIRS-Patienten stark reduziert und nimmt im Serum des septischen Patienten weiter drastisch ab im Vergleich zu männlichen gesunden Freiwilligen. Am T_3 zeigt die miR-150 die geringste Expression und/oder wird abgebaut (s. Abbildung 3.31A). MiR-146a zeigt im Serum des SIRS-Patienten, verglichen mit männlichen gesunden Freiwilligen, ebenfalls eine verringerte Expression. Wie im Fall von miR-150, zeigt auch miR-146a im Serum septischen Patienten an T_3 eine sehr geringe Expression (s. Abbildung 3.31B).

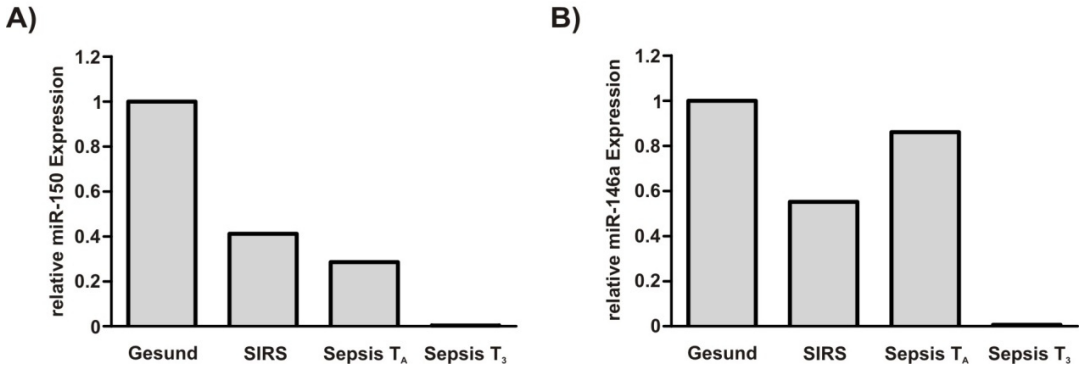

Abbildung 3.31 Expression von miR-150 und miR-146a im Serum eines SIRS- und eines Sepsis-Patienten. Die miRNAs wurden aus dem Serum von gesunden Freiwilligen, einem SIRS-Patienten sowie einem Sepsis-Patient am Tag der Aufnahme (T_A) und Tag 3 der Sepsis-Diagnose (T_3) präpariert. Die relative Expression der miR-150 (A) und miR-146a (B) wurde durch qPCR ermittelt. Als Normalisierungskontrolle wurde cel-miR-39 verwendet. Alle Serumproben stammen von männlichen Freiwilligen bzw. Patienten.

Die Vorarbeiten zur effektiven und reproduzierbaren Isolation von extrazellulären miRNAs aus humanem Serum wurden als Grundlage für eine medizinische Doktorarbeit genutzt. Diese beschäftigt sich mit der Expression spezifischer zirkulierender miRNAs in Seren septischer

Patienten sowie deren Korrelation mit klinischen Parametern. Die medizinische Doktorarbeit ist derzeit noch nicht abgeschlossen.

3.6 Isolierung von Exosomen aus LPS-aktivierten Makrophagen

Kürzlich veröffentlichte Studien haben gezeigt, dass die Sekretion von zirkulierenden miRNAs durch den Transport in Mikrovesikeln, wie z.B. Exosomen, oder durch die Bindung der miRNAs an Ago2 oder an Lipoproteine erfolgen kann (Zhang et al. 2010; Arroyo et al. 2011; Vickers et al. 2011). Darüber hinaus ermöglicht die Lokalisation in Mikrovesikel, dass extrazelluläre miRNAs trotz hoher, extrazellulärer RNase Aktivität relativ stabil in den verschiedensten Körperflüssigkeiten zirkulieren (Mitchell et al. 2008). Interessanterweise stellen sezernierte miRNAs eine neue Form der Zell-Zell-Kommunikation dar. Durch den horizontalen Transfer von sezernierten miRNAs können Donor-Zellen die Genexpression in Rezipienten-Zellen beeinflussen (Chen et al. 2012; Alexander et al. 2015).

In Zusammenarbeit mit Dr. Isabel Naarmann-de Vries (Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care, UK Aachen) wurden Vorversuche zur Isolierung von Exosomen aus dem Medium-Überstand von unbehandelten und LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen durchgeführt. Darüber hinaus wurde in ersten Experimenten analysiert, ob miRNAs in isolierten Exosomen angereichert sind. Da es sich bei miR-155 (diese Arbeit) und miR-146a (Taganov et al. 2006) um LPS-induzierte miRNAs handelt (s. Abbildung 3.2, links und Abbildung 3.3), wurden diese beiden miRNAs für die Analyse ausgewählt. Um zunächst zu überprüfen, ob es sich bei der isolierten Fraktion um Exosomen handelt, wurde im Western Blot die Expression von Ago2 und CD63 untersucht (s. Abbildung 3.32A). Letzteres gehört zu der Familie der Tetraspanine, Membranproteine die in Exosomen angereichert sind und als Markerproteine dienen (Hulsmans und Holvoet 2013). Als Positivkontrolle wurde RAW 264.7 Zelllysat im Western Blot genutzt. Abbildung 3.32 (Spur 3 und 4) zeigt, dass im Zelllysat die drei Isoformen des CD63 Proteins detektiert werden konnten, von denen zwei in den Exosomen aus unbehandelten und LPS-aktivierten Makrophagen ebenfalls nachgwiesen wurden (s. Abbildung 3.32, Spur 3 und 4). Dies deutet darauf hin, dass aus den Zellen sezernierte Exosomen erfolgreich isoliert werden konnten. Das miRNA-bindenden Protein Ago2 konnte in ersten Western Blot Experimenten dagegen nicht erfolgreich in der gereinigten Exosomenfraktion detektiert werden. Um die LPS-Stimulation der RAW 264.7 Zellen zu überprüfen, wurde zunächst die Expression der miRNAs 155 und 146a analysiert (s. Abbildung 3.32B). Die Hochregulation der beiden miRNAs ist vergleichbar mit dem bereits zuvor gemessenen relativen Expressionslevel (s. Abbildung 3.4A). Aus den isolierten Exosomen wurde die RNA präpariert und die Expression von miR-155 und miR-146a durch qPCR untersucht (s. Abbildung

3.32C, D). Es zeigte sich, dass beide miRNAs in den isolierten Exosomen nachgewiesen werden können. Dabei ist miR-155 in den Exosomen aus LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen im Vergleich zu den Exosomen aus unbehandelten Zellen ca. 8-fach angereichert (s Abbildung 3.32D, links). Auch miR-146a weist eine leichte Anreicherung (ca. 1,25-fache) in den Exosomen aus LPS-behandelten Makrophagen auf (s. Abbildung 3.32 D, rechts). Diese Ergebnisse zeigen, dass aus RAW 264.7 Zellen sezernierte Exosomen erfolgreich isoliert werden konnten und die durch die LPS-Stimulation induzierten miRNAs 155 und 146a in Exosomen verpackt werden.

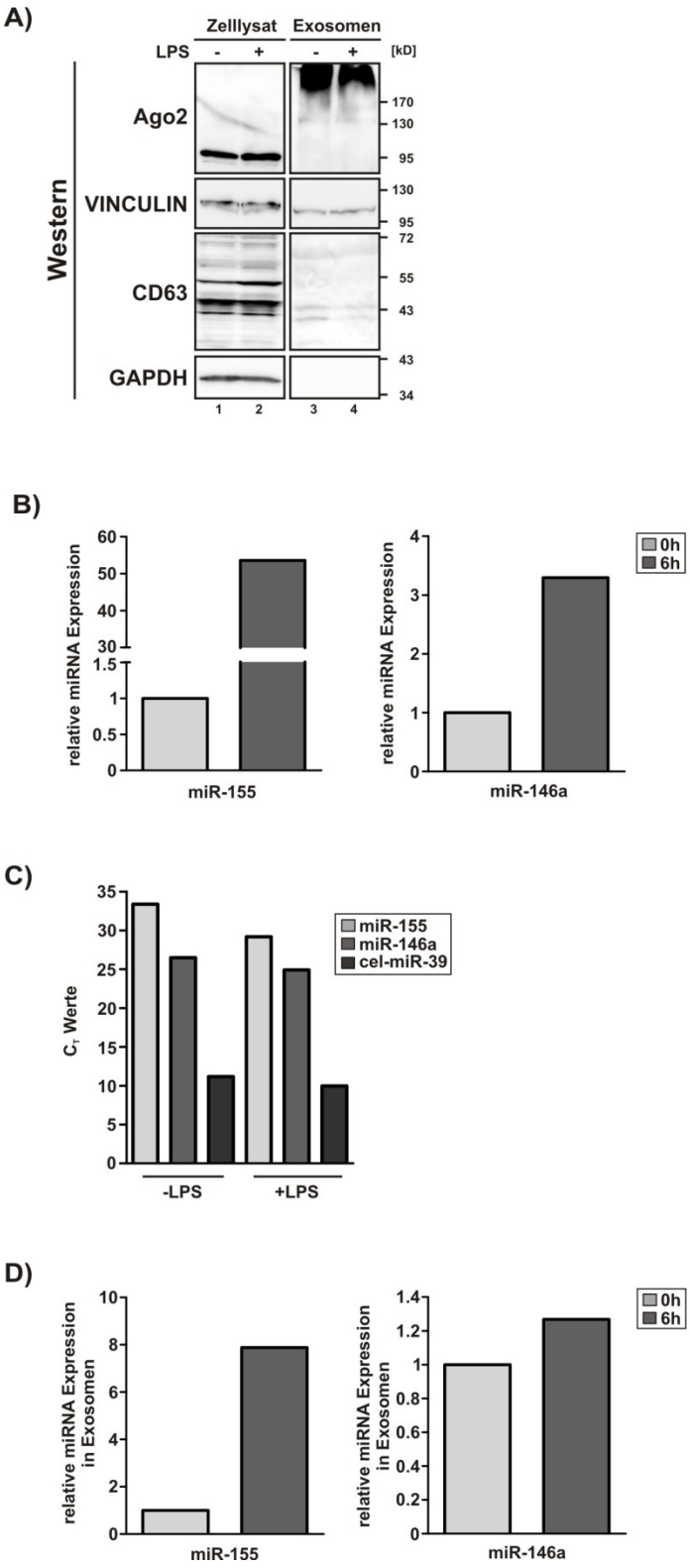

Abbildung 3.32 Isolierung von Exosomen aus LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen. (A) Western Blot Analyse der Ago2 Proteinlevel sowie des Exosomenmarkerproteins CD63 im Zelllysat und in isolierten Exosomen aus unbehandelten oder LPS-aktivierten Makrophagen. VINCULIN und GAPDH dienten als Ladekontrolle. (B) Mittels qPCR wurde die LPS-induzierte Expression von miR-155 und miR-146a in RAW 264.7 Zellen überprüft. Als endogene Normalisierungskontrolle wurde U6 snRNA verwendet. (C) C_T-Werte der aus den Exosomen isolierten miRNAs sowie der *spike-in* Kontrolle cel-miR-39. (D) Durch qPCR wurde die Expression der miR-155 und miR-146a aus den isolierten Exosomen bestimmt. Als Normalisierungskontrolle diente cel-miR-39.

4 Diskussion und Ausblick

Als Effektorzellen des Immunsystems erkennen Makrophagen eindringende, mikrobielle Pathogene durch die Familie der TLRs. Die Bindung von LPS an den TLR4 löst intrazelluläre Signalkaskaden aus, um durch die resultierende Sekretion von Zytokinen und Chemokinen weitere Immunzellen zu aktivieren und einer sich ausbreitenden Infektion entgegen zu wirken (s. Abschnitt 1.1.3) (Takeda und Akira 2004; Ulloa und Tracey 2005; Akira et al. 2006). Ferner führt die durch LPS ausgelöste Aktivierung des TLR4 Signalwegs zur Expression anti-apoptotischer Gene (Conte et al. 2006; Lombardo et al. 2007). Der Verlauf der Entzündungsreaktion ist durch die unterschiedlichen Expressionsprofile hunderter Gene charakterisiert (Swearingen et al. 2010; Eichelbaum und Krijgsveld 2014). Eine strikt kontrollierte Immunantwort ist dabei ausschlaggebend, um der Entstehung von chronischen Entzündungen, der Entwicklung einer Sepsis oder der Ausbildung maligner Tumore entgegenzuwirken (Lin und Karin 2007; Bosmann und Ward 2013; Carpenter et al. 2014). Die Regulation der inflammatorischen Genexpression kann auf mehreren Ebenen erfolgen: auf der Ebene der Transkription (Transkriptionsfaktoren, *Enhancer* Elemente) (Smale und Natoli 2014) sowie post-transkriptional (prä-mRNA Spleißen, mRNA Polyadenylierung, mRNA Stabilität und mRNA Translation) (Carpenter et al. 2014), bis hin zu post-translationalen Modifikationen von Proteinen, die an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind (Phosphorylierung, Acetylierung oder Methylierung) (Ito 2007).

Weiterhin sind miRNAs als wichtige positive und negative post-transkriptionale Modulatoren der angeborenen Immunantwort identifiziert worden. MiRNAs sind dabei Teil von dynamischen und regulatorischen Signalnetzwerken, die eine schnelle Anpassung an sich ändernde, äußere Bedingungen, wie z.B. während einer Infektion, erlauben (O'Neill et al. 2011; Boldin und Baltimore 2012). Ihre Funktion üben miRNAs durch die Bindung an die 3'UTR ihrer jeweiligen Ziel-mRNA(s) aus, wodurch die Translation der mRNA inhibiert oder ihre Stabilität beeinflusst werden kann (s. Abschnitt 1.4.2) (Jonas und Izaurralde 2015). Dabei wirken miRNAs weniger als regulatorische „An-Aus"-Schalter, sondern durch *fine-tuning* der Genexpression vielmehr modulatorisch (O'Neill et al. 2011; Landskroner-Eiger et al. 2013). Eine einzelne miRNA ist in der Lage eine Vielzahl von Ziel-mRNAs zu regulieren (Lewis et al. 2005) (s. Tabelle 17), wobei die molekularen Abläufe, die der miRNA-vermittelten post-transkriptionalen Regulation zugrunde liegen, oftmals noch nicht aufgeklärt sind.

Der in dieser Arbeit aufgeklärte funktionale Mechanismus, mit dem die LPS-induzierte miR-155- die CASP-3 mRNA reguliert, trägt zum Verständnis der post-transkriptionalen Regulation der inflammatorischen Genexpression in Makrophagen bei.

4.1 Zur Identifizierung differentiell regulierter miRNAs in LPS-aktivierten Makrophagen

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit stellte die Identifizierung differentiell regulierter miRNAs in der Immunantwort von Maus-Makrophagen dar. Zu diesem Zweck wurden cDNA-Bibliotheken, die aus unbehandelten oder LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen generiert wurden, mittels Hochdurchsatzsequenzierung analysiert. Insgesamt konnten 41 miRNAs identifiziert werden, deren Expression nach sechsstündiger LPS-Stimulation induziert war sowie 84 miRNAs, deren Expression nach LPS-Behandlung verringert war (s. Abbildung 3.2). Dabei wurden die miRNAs berücksichtigt, welche in einer der beiden cDNA-Bibliotheken, die aus Gesamt-RNA kloniert wurden, mindestens 30 *reads* erreicht hatten. Dieses Kriterium wurde angelegt, um zum einen auszuschließen, dass im Zuge der Klonierung der cDNA-Bibliotheken durch die Größenfraktionierung miRNAs aus dem RNA-Pool verloren gegangen sein könnten. Zum anderen sollte durch die Festlegung einer Mindestanzahl an *reads* die Analyse falsch positiver miRNA-Kandidaten vermieden werden.

Zahlreiche miRNAs sind an der Regulation der inflammatorischen Antwort, insbesondere der NF-κB-Antwort, beteiligt (O'Neill et al. 2011), von denen einige durch die hier durchgeführte Hochdurchsatzsequenzierung detektiert werden konnten. Die LPS-induzierte miR-146a (s. Abbildung 3.2 links) beispielsweise, ist Teil eines negativen *feedback*-Mechanismus. MiR-146a trägt durch die Inhibierung ihrer Ziel-mRNAs, welche für die TLR4-Signalweg Komponenten IRAK1 und TRAF6 kodieren, zum Abschwächen der TLR4-vermittelten Entzündungsreaktion bei (Taganov et al. 2006). Auch miR-21 spielt eine essentielle Rolle in der negativen Regulation der LPS-vermittelten Entzündungsreaktion (Quinn und O'Neill 2011). Die LPS-induzierte miRNA-21 (s. Abbildung 3.2 links) kontrolliert die Expression des pro-inflammatorischen Proteins PDCD4 (*programmed cell death protein 4*), welches die Aktivierung von NF-κB begünstigt und das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 inhibiert (Sheedy et al. 2010). Darüber hinaus sind einige miRNAs bekannt, deren Expression während der LPS-Antwort reduziert ist, wobei es zu diesem Aspekt der miRNA-vermittelten Regulation der Immunantwort noch nicht viele Untersuchungen gibt. In RAW 264.7 Zellen beispielsweise, ist die miR-125b Expression nach der LPS-Stimulation verringert (s. Abbildung 3.2 rechts), wodurch die Inhibierung der TNF-α Ziel-mRNA aufgehoben ist (Tili et al. 2007). Eine weitere Studie zeigte, dass in humanen Epithelzellen des Gallenganges die miRNA let-7i den Rezeptor TLR4 post-transkriptional inhibiert. Infolge einer parasitären Infektion ist die let-7i Expression jedoch reduziert und die Immunantwort der Epithelzellen kann initiiert werden (Chen et al. 2007). Darüber hinaus zeigte eine weiterführende Studie, dass im Zuge der ausgelösten Entzündungsreaktion, die Transkription des let-7i Gens, aufgrund der Bindung der NF-κB Untereinheit p50 und des Transkriptionsfaktors C/EBPβ an den miRNA Promotor, inhibiert ist

(O'Hara et al. 2010). Ferner können miRNAs, deren Expression verringert ist, in die Regulation der Endotoxin Toleranz involviert sein. In LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen zum Beispiel, nimmt die Expression von miR-98 ab (s. Abbildung 3.2 rechts) und inhibiert somit nicht mehr die LPS-induzierten Translation ihrer Ziel-mRNA IL-10 (Liu et al. 2011). Somit könnte miR-98 zur Kontrolle der pro-inflammatorischen Antwort und der Induktion der Endotoxin-Toleranz beitragen.

Im nächsten Schritt der Sequenzdatenanalyse wurden die miRNA Kandidaten im Hinblick auf ihre Abundanz, die Änderung der Expression infolge der LPS-Stimulation sowie potentieller Ziel-mRNAs, welche im Zusammenhang mit der Immunantwort der Makrophagen stehen, weiter kategorisiert. Die Expression der daraufhin ausgewählten miRNAs wurde mittels Northern Blot und qPCR in RAW 264.7 Zellen validiert (s. Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4). Die stärkste Änderung der Expression zeigte dabei miR-155 (s. Abbildung 3.2 links), welche in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen ca. 40-fach induziert ist (s. Abbildung 3.3). Da miR-155 in unbehandelten Makrophagen kaum exprimiert wird (s. Tabelle 15), weist die LPS-vermittelte Induktion auf eine bedeutende Rolle der miRNA während der Immunantwort in Makrophagen hin. Ferner ist aufgrund dieser starken Änderung der miR-155 Expression ein deutlich detektierbarer Effekt auf *downstream* gelegene Ziel-mRNAs in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen zu erwarten. Im Falle einer geringeren Expressionsänderung, z.B. zweifach, würden Effekte auf die jeweilige Ziel-mRNA wahrscheinlich schwierig nachzuweisen sein.

4.2 Zur Destabilisierung der CASP-3 mRNA durch die miR-155

Durch *in silico* Vorhersagen wurde CASP-3 als potentielle miR-155 Ziel-mRNA identifiziert (s. Tabelle 17 und Abbildung 3.6). Sequenzvergleiche der CASP-3 mRNA 3'UTR zeigten, dass die Bindestelle für miR-155 zwischen verschiedenen Spezies konserviert ist (s. Abbildung 3.6), was auf eine mögliche Funktionalität hinweist. Die Protease gehört zu den wesentlichen Mediatoren des programmierten Zelltods und kann infolge eines apoptotischen Stimulus durch den intrinsischen oder extrinsischen Signalweg aktiviert werden (s. Abschnitt 1.6) (Parrish et al. 2013). Die in der Zelle als inaktives Zymogen vorliegende Procaspase-3 wird durch Initiator-Caspasen, wie Caspase-8 oder -9, proteolytisch gespalten und auf diese Weise aktiviert (Earnshaw et al. 1999). Die aktive gespaltene CASP-3 kann nun ihrerseits Substrate, zelluläre Schlüsselproteine wie beispielsweise das DNA-Reparaturprotein PARP-1 oder den Caspase-Inhibitor XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*), spezifisch spalten (Fischer et al. 2003). Die Aktivität der CASP-3 ist im Verlauf der Apoptose für die DNA-Fragmentation, Chromatin Kondensierung und der Bildung von Apoptosekörperchen verantwortlich (Porter und Janicke 1999).

Um die Hypothese zu untersuchen, ob die miR-155 Expression im Zusammenhang mit Apoptosekontrolle während der Immunantwort in Makrophagen steht, wurde in der vorliegenden Arbeit eine potentielle Modulation der CASP-3 mRNA durch die LPS-induzierte miR-155 in RAW 264.7 Zellen analysiert.

Die LPS-vermittelte Aktivierung von primären Makrophagen, die aus dem Knochenmark von C57BL/6 wt Mäusen extrahiert und ausdifferenziert wurden, machte deutlich, dass die miR-155 Expression, wie zuvor in der immortalisierten Zelllinie detektiert, induziert wird. Dabei ist interessanterweise eine gleichzeitige Reduktion der CASP-3 mRNA (s. Abbildung 3.8) detektierbar. Die LPS-Stimulation von BMDM aus $TLR4^{-/-}$-Mäusen dagegen zeigte, dass durch die TLR4-abhängige miR-155 Induktion (Schulte et al. 2013) die CASP-3 mRNA, anders als in wt-BMDM, nicht verringert ist- vermutlich aufgrund der deutlich reduzierten Abundanz der miR-155 (s. Abbildung 3.8). Um ihre Funktion auszuüben, assoziiert die reife miRNA mit dem Protein Ago2 und bildet so den *miRNA-induced silencing complex* (miRISC). Der miRISC vermittelt mit Hilfe weiterer Faktoren (s. Abschnitt 1.4.2) die post-transkriptionale Regulation der miRNA Ziel-mRNA (Jonas und Izaurralde 2015). Durch Ago2 Immunopräzipitation konnte demonstriert werden, dass miR-155 und CASP-3 mRNA Teil eines funktionalen miRISC sind (s. Abbildung 3.9B und C). Wie zuvor in den Primärzellen beobachtet, korreliert auch in zytoplasmatischen Extrakten aus LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen der Anstieg der miR-155 mit einer Reduktion der CASP-3 mRNA auf 35 % (s. Abbildung 3.10). Im Einklang mit diesen Ergebnissen sind der endogene Proteinlevel der Procaspase-3 und der gespaltenen CASP-3 in zytoplasmatischen Extrakten aus aktivierten Makrophagen im Vergleich zu unbehandelten Zellen verringert (s. Abbildung 3.11A rechts). Aus diesen Ergebnissen lassen sich erste Schlüsse ziehen, dass die Stabilität der CASP-3 mRNA während der Entzündungsreaktion in den Makrophagen beeinflusst ist.

Um den spezifischen Effekt der miR-155 auf CASP-3 mRNA zu untersuchen, wurden RAW 264.7 Zellen mit *antisense* RNA-Oligonukleotiden, sogenannten antagomirs (Krutzfeldt et al. 2005), für 48 h transfiziert. Chemische Modifikationen verleihen den antagomirs eine erhöhte Stabilität und inhibieren den enzymatischen Abbau (Lennox und Behlke 2011). Die Transfektion von LPS-stimulierten RAW 264.7 Zellen mit antagomir-155 bedingt die effektive Reduktion der reifen miR-155, wobei gleichzeitig ein signifikanter Anstieg der CASP-3 mRNA beobachtet werden kann (s. Abbildung 3.12A und B). Die Induktion der miR-155 in LPS-aktivierten Makrophagen, welche zuvor mit dem als Kontrolle dienenden antagomir-122 transfiziert wurden, erfolgt in gleichem Maße wie in untransfizierten RAW 264.7 Zellen, die mit LPS behandelt wurden (vergleiche Abbildung 3.12A mit Abbildung 3.3A). Dies verdeutlicht die Spezifität des antagomir-155. Wie zuvor beobachtet, ist CASP-3 mRNA in antagomir-122 transfizierten Makrophagen reduziert (vergleiche Abbildung

3.12B mit Abbildung 3.11A links). Damit übereinstimmend hebt antagomir-155 die LPS-bedingte Reduktion des CASP-3 Proteins auf (s. Abbildung 3.12C). In Anwesenheit von antagomir-155 ist CASP-3 mRNA erhöht, was mit einem ansteigenden CASP-3 Proteingehalt einhergeht. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die LPS-induzierte miR-155 die Expression der CASP-3 mRNA, vermutlich durch die Beeinflussung der mRNA Stabilität, moduliert. Diese Theorie stützen *in vivo* Versuche, in denen unbehandelte RAW 264.7 Zellen mit einem miR-155 *mimic,* zur Steigerung des miR-155-vermittelten Effekts*,* und Firefly Luciferase (fLUC) CASP-3 Reporter mRNAs co-transfiziert wurden. In Anwesenheit des miR-155 *mimics* nimmt die Translation der fLUC-CASP-3 Reporter mRNA, welche die funktionale miR-155 Bindestelle trägt, deutlich ab, verglichen mit der fLUC-CASP-3 Reporter mRNA, welche die mutierte Version der miRNA Zielsequenz trägt (s. Abbildung 3.14). Diese Experimente zeigen, dass die einzelne, physiologische miR-155 Bindestelle in der CASP-3 mRNA 3'UTR die Modulation der Protease in RAW 264.7 Zellen bedingt. *In vitro* Translationsassays in zytoplasmatischen Extrakten aus unbehandelten und LPS-stimulierten Makrophagen sollten im Anschluss abschließend klären, ob diese Modulation tatsächlich die Destabilisierung der CASP-3 mRNA beinhaltet (s. Abbildung 3.17).

Zur initialen Etablierung der *in vitro* Translationsexperimente wurden zunächst fLUC-TRAF6 mRNA Reporter kloniert, welche 504 bp der TRAF6 3'UTR mit zwei wt miR-146a Bindestellen oder die jeweils mutierten Varianten beinhalteten (s. Abbildung 3.15A) (Taganov et al. 2006). In LPS-stimulierten Makrophagen, in denen die Expression der miR-146a induziert ist (s. Abbildung 3.3), sinkt die relative Translation des fLUC TRAF6 wt Reporters um ca. 26 %. Multiple miRNA-Bindestellen innerhalb der Ziel-mRNA 3'UTR können den Effekt der Reduktion der jeweiligen mRNA Translation verstärken (Witkos et al. 2011). Die 26 %-ige Reduktion der relativen TRAF6 Translation bei zwei miR-146a Bindestellen ist demzufolge verhältnismäßig gering. Dies ist darauf zurück zu führen, dass, wie auch in anderen zellfreien Systemen gezeigt, für die *in vitro* Translationsassays die Vorinkubation der Translationsreaktionen notwendig ist, um eine aktive Assemblierung des miRISC zu erlauben bevor die Translation initiiert wird (Mathonnet et al. 2007; Thermann und Hentze 2007). Aus diesem Grund wurden in nachfolgenden *in vitro* Translationsexperimenten die Komponenten vorinkubiert.

In unstimulierten RAW 264.7 Zellen, in denen miR-155 kaum exprimiert wird (s. Abbildung 3.2 links und Tabelle 15), ist die Translation der fLUC-CASP-3 Reporter mRNAs mit der einzelnen, intakten oder der mutierten miR-155 Bindestelle wie erwartet gleich effizient (s. Abbildung 3.17B links). Nach LPS Stimulation ist jedoch die Translation des fLUC-CASP-3 wt Reporters signifikant um 35 % reduziert (s. Abbildung 3.17B rechts). Anders als in anderen Untersuchungen (Taganov et al. 2006; Lu et al. 2009; O'Connell et al. 2009), wurde in diesem Experiment bewusst auf die

zusätzliche Transfektion eines miRNA *mimics* verzichtet, um die Regulation der fLUC-CASP-3 mRNA einzig auf die endogene und durch LPS induzierte miR-155 zurückführen zu können. Die Bestimmung der CASP-3 mRNA Stabilität zeigte, dass CASP-3 mRNA in Gegenwart der intakten miR-155 Bindestelle in LPS-aktivierten Makrophagen signifikant destabilisiert wird (s. Abbildung 3.17C). In der vorliegenden Arbeit konnte also demonstriert werden, dass CASP-3 mRNA eine Ziel-mRNA der LPS-induzierten miR-155 in RAW 264.7 Zellen ist. Die miRNA-vermittelte post-transkriptionale Modulation der CASP-3 mRNA geht dabei mit deren Destabilisierung einher.

Da eine unkontrollierte Caspase-Aktivierung schwerwiegende Folgen mit sich bringen kann, ist die Synthese, die Prozessierung und die Aktivität von Caspasen auf verschiedenen Ebenen streng reguliert (Earnshaw et al. 1999). Die Prozessierung von Procaspasen sowie ihre katalytische Aktivität können durch die Interaktion mit IAP (*inhibitor of apoptosis*) Proteinen, wie z.B. ciap2 oder XIAP, reguliert werden (Deveraux et al. 1997; Earnshaw et al. 1999). Ciap2, dessen Expression auch durch LPS induziert wird (Conte et al. 2006), bindet und inhibiert die aktive CASP-3 und -7 (Roy et al. 1997; Mica et al. 2004). Ferner wurde gezeigt, dass diese anti-apoptotischen Proteine Procaspase-9 binden und die Aktivierung verhindern können (Deveraux et al. 1998). Zudem zeigten verschiedene Studien, dass aktive Caspasen auch durch post-translationale Modifizierungen reguliert werden (Earnshaw et al. 1999). In humanen Leukämiezellen konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass CASP-3 und -6 phosphoryliert vorliegen, wodurch ihre enzymatische Aktivität beeinflusst wird. Im dephosphorylierten Zustand tritt eine vermehrte Prozessierung des Substrates PARP-1 auf, so dass davon ausgegangen wird, dass die Phosphorylierung der aktiven CASP-3 die Spaltung spezifischer Substrate inhibiert (Martins et al. 1998; Earnshaw et al. 1999).

Zur post-transkriptionalen Regulation von Caspasen gibt es nur wenige Untersuchungen. Eine Studie zeigte, dass in HeLa Zellen das RBP HuR (*human antigen R*) in Abwesenheit eines apoptotischen Stimulus (s. Abschnitt 1.6) sowohl pro-apoptotische (CASP-9) als auch anti-apoptotische mRNAs (ProT, Prothymosin α) bindet. Nach SSP-Behandlung der Zellen wird HuR gespalten und die beiden generierten Spaltprodukte binden selektiv die CASP-9 mRNA, stabilisieren diese und fördern so die Apoptose (von Roretz et al. 2013). Eine andere Arbeit zeigte, dass in Skelettmuskeln von Mäusen und Ratten CASP-3 mRNA in allen Entwicklungsstadien detektierbar ist, während das CASP-3 Protein nur im frühen postnatalen Stadium oder in regenerierenden Muskeln detektiert werden kann. Möglicherweise ist CASP-3 in diesen Stadien an der Entfernung von Muskelbestandteilen beteiligt, wobei jedoch nicht klar ist, durch welchen Mechanismus die post-transkriptionale Regulation erfolgt (Ruest et al. 2002).

4.3 Zur translationalen Inhibierung der IKKε mRNA durch die miR-155

IKKε gehört neben TBK1 zu den nicht-kanonischen IKKs (IκB Kinasen), die vorwiegend in Immunzellen exprimiert werden und über den TRIF-abhängigen Signalweg durch LPS, inflammatorische Zytokine (Shimada et al. 1999) oder durch virale Nukleinsäuren über den TLR3 aktiviert werden (Kawai und Akira 2010). Nach der Aktivierung katalysiert IKKε die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7, die nach einer Konformationsänderung in den Nukleus translozieren und die Expression verschiedener Interferone (IFN-α, INF-β, IFN-γ) induzieren (Ng et al. 2011) (s. Abschnitt 1.1.3). Diese wichtigen Effektorproteine der angeborenen Immunantwort können durch die Bindung an spezifische Rezeptoren den JAK/STAT Signalweg initiieren und somit die Transkription vieler IFN-stimulierte Gene aktivieren (Schoggins und Rice 2011).

IKKε wurde als Ziel-mRNA der miR-155 identifiziert und in verschiedenen Zelllinien validiert (Tili et al. 2007; Lu et al. 2008; Xiao et al. 2009; Long et al. 2013). Jedoch konnte durch Überexpression oder durch Inhibierung der miR-155, der zugrunde liegende Mechanismus der miRNA-vermittelten Hemmung der IKKε mRNA Expression nicht vollständig aufgeklärt werden (Xiao et al. 2009; Long et al. 2013). Nach sechsstündiger LPS-Stimulation ist der IKKε mRNA Level in RAW 264.7 Zellen im Vergleich zu unbehandelten Makrophagen signifikant erhöht, während Untersuchungen des endogenen IKKε Proteins die Abnahme der Kinase nach 6 h LPS-Behandlung deutlich machen (s. Abbildung 3.11B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass miR-155, anders als im Fall von CASP-3 mRNA (s. Abschnitt 4.2), die translationale Inhibierung der IKKε mRNA vermittelt. In dieser Arbeit wurde fortan für die zunächst als Spezifitätskontrolle mitgeführte IKKε mRNA, der miR-155-abhängige Mechanismus der post-transkriptionalen Modulation untersucht. *In vitro* Translationsexperimente in zytoplasmatischen Extrakten von LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen zeigten, dass die LPS-induzierte miR-155 tatsächlich die Translation der IKKε mRNA inhibiert (s. Abbildung 3.18B), jedoch anders als im Fall der CASP-3 mRNA (s. Abschnitt 4.2), nicht die mRNA-Stabilität reduziert (s. Abbildung 3.17C). Bisher ist in der Literatur wenig zur Regulation der IKKε Expression bekannt. Einige Studien untersuchten die Regulation von IKKε auf Ebene der Transkription. In einer immortalisierten, humanen Knorpelzelllinie konnte gezeigt werden, dass die durch TNF-α und IL-1β ausgelöste, gesteigerte Expression von IKKε auf die Aktivierung des IKKε Promotors durch das NF-κB Protein p65 zurückzuführen ist (Wang et al. 2005). Ferner wurde nachgewiesen, dass IKKε transkriptional durch den Transkriptionsfaktor STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) aktiviert wird (Guo et al. 2013). Dies war eine Folge der Initiierung des STAT-Signalwegs durch karzinogene Substanzen des Tabakrauches. In dieser Arbeit werden nun erstmals Hinweise auf eine miRNA-vermittelte post-transkriptionale Regulation der IKKε

mRNA während der LPS-Antwort von Makrophagen dokumentiert. Durch Reduktion der IKKε Synthese und einer daraus eventuell resultierenden Abnahme der Expression von Interferonen könnte miR-155 dazu beitragen, der inflammatorischen Antwort entgegen zu wirken.

4.4 Zum Modell der miRNA-vermittelten Regulation der Genexpression

MiRNAs setzen sich mit Argonaut (Ago) Proteinen zu *miRNA-induced silencing* Komplexen (miRISCs) zusammen, um post-transkriptional die Inhibierung ihrer partiell komplementären Ziel-mRNAs zu vermitteln. Die post-transkriptionale Regulation erfolgt durch eine Kombination aus translationaler Inhibierung und Destabilisierung der mRNA, wobei sich zeigt, dass ein komplexes Zusammenspiel zwischen den beiden genannten Mechanismen besteht (Jonas und Izaurralde 2015). Genomweite Untersuchungen, welche die miRNA-vermittelten Effekte auf mRNA- und Proteinebene untersucht haben, machten in Kombination mit Ribosomen-*profiling* Experimenten deutlich, dass der Abbau der Ziel-mRNA ein weitverbreiteter Effekt ist. In kultivierten Säugetierzellen erfolgt in 66-99 % der Fälle die Inhibierung der mRNA Expression durch den Abbau derselben, während in nur 6-26 % eine translationale Repression stattfindet (Baek et al. 2008; Guo et al. 2010; Eichhorn et al. 2014). Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Mechanismen zu charakterisieren, die eine möglicherweise zell- oder gewebespezifische post-transkriptionale Regulation von miRNA Ziel-mRNAs steuern (Wilczynska und Bushell 2015).

Die Destabilisierung von miRNA Ziel-mRNAs wird durch Enzyme des 5' → 3' RNA-Abbauweges katalysiert (s. Abschnitt 1.4.2). Zunächst werden die Ziel-mRNAs durch die aufeinanderfolgende Aktivität der Deadenylase-Komplexe PAN2-PAN3 und CCR4-NOT deadenyliert (Wahle und Winkler 2013). Durch DCP2, unterstützt von weiteren Co-Faktoren wie DCP1 oder DDX6, wird nachfolgend die cap-Struktur der mRNA entfernt und die mRNA durch die Exoribonuklease XRN1 weiter 5' → 3' degradiert (Jonas und Izaurralde 2013). Direkte Interaktionen zwischen den Untereinheiten der involvierten, katalytischen Komplexe gewährleisten dabei einen effizienten mRNA Abbau. In Oozyten, frühen Embryonalstadien und neuronalen Zellen (Wu et al. 2010; Muddashetty et al. 2011; Jonas und Izaurralde 2015) dagegen können miRNA Ziel-mRNAs in einem deadenylierten, translational reprimierten Zustand akkumulieren ohne weiter abgebaut zu werden. Möglicherweise um nach erneuter Polyadenylierung zu einem späteren Zeitpunkt wieder in den Translationspool zurückzukehren (Muddashetty et al. 2011; Wilczynska und Bushell 2015). Durch Proteine der GW182 Familie rekrutieren funktionale miRISCs die Komponenten der beschriebenen Abbaumaschinerie direkt zu den jeweiligen miRNA Ziel-mRNAs. Über ihre Tryptophanreste können GW182 Proteine nicht nur mit Ago2, sondern auch mit Untereinheiten der Deadenylase-Komplexe, PAN-3 und NOT1 (Braun et al. 2011; Fabian et al. 2011) sowie mit

dem poly(A) Schwanz bindenden Protein PABPC interagieren (Huntzinger et al. 2013). Die Assoziation von GW182 mit PABPC könnte dabei aus zwei Gründen erfolgen. Zum einen könnte die Bindung zwischen GW182 und PABPC zur Verankerung des miRISC mit polyadenylierten mRNAs dienen (Jonas und Izaurralde 2015). Zum anderen könnte durch die Interaktion die eigentliche Funktion des PABPC, die Stimulation der cap-abhängigen Translation, beeinträchtigt werden und somit zur Inhibierung der mRNA beitragen (Zekri et al. 2009). Untersuchungen in zellfreien Extrakten zeigten, dass in Abwesenheit von PABPC die Deadenylierung von miRNA Ziel-mRNAs aufgehoben ist (Fabian et al. 2009).

Der Mechanismus der translationalen Inhibierung von miRNA Ziel-mRNAs wurde in der Literatur lange kontrovers diskutiert. Mit Hilfe von Ribosomen-*profiling* Experimenten, welche exakte Messungen von Translationseffizienzen erlauben, konnte jedoch gezeigt werden, dass miRNAs die Initiation der mRNA Translation inhibieren (Humphreys et al. 2005; Thermann und Hentze 2007). Dies geschieht vermutlich durch Interaktion des miRISC mit dem eukaryotischen Translations-initiationsfaktor eIF4A, einer RNA Helikase. Diese windet Sekundärstrukturen in der 5' Region einer mRNA auf, um dem 43S-Präinitiationskomplex zu erlauben die 5' UTR bis zum AUG Startcodon zu scannen (Jackson et al. 2010). Durch die Störung der eIF4A Funktion wird die Initiation der Proteinsynthese beeinträchtigt (Izaurralde 2015).

4.5 Zur Apoptosekontrolle während der Immunantwort

Monozyten und Makrophagen sind essentielle Komponenten der angeborenen Immunantwort und für die Verteidigung des Organismus gegen eindringenden Pathogene verantwortlich (Ginhoux und Jung 2014). Erstere stammen von myeloiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab und zirkulieren für 24 - 48 Stunden im Blutkreislauf (Cline et al. 1978), bis sie in Abwesenheit einer Infektion durch spontane Apoptose abgebaut werden (Fahy et al. 1999). Im Falle einer Infektion aber, differenzieren Monozyten zu Makrophagen, welche eine Lebensdauer von bis zu drei Monaten haben und eine höhere Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli besitzen (Thomas et al. 1976). Ein komplexes, ausgeglichenes Netzwerk bestimmt das Überleben oder den Zelltod von Immunzellen. Beispielsweise inhibieren gesteigerte Level von Hsp27 (*heat shock protein 27*) in Makrophagen die Aktivierung von CASP-3, der Caspase, die für die Apoptose von Monozyten verantwortlich ist (Voss et al. 2007). Weiterhin tragen im Falle einer Infektion inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, durch Aktivierung der Kinase AKT und der resultierenden Inhibierung der CASP-3 Aktivität, zum Überleben der Monozyten bei und sorgen dadurch für die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion (Goyal et al. 2002; Parihar et al. 2010). Im Blut zirkulierende neutrophile Granulozyten haben eine Lebenszeit von weniger als

einem Tag und werden konstitutiv durch Apoptose eliminiert (Summers et al. 2010). In LPS-behandelten Neutrophilen dagegen, ist das anti-apoptotische Gen ciap2 induziert, wodurch CASP-3 ubiquitiniert und abgebaut und somit der Zelltod der neutrophilen Granulozyten verzögert wird (Mica et al. 2004).

Zur Beteiligung von miRNAs an der Apoptosekontrolle während der inflammatorischen Antwort ist bisher wenig bekannt. Vorangegangene Studien haben sich überwiegend mit der Untersuchung pro- und anti-apoptotischer miRNAs im Kontext mit malignen Tumoren beschäftigt (Wang 2010). So ist beispielsweise die Expression von miR-15 und miR-16 in Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (*chronic lymphocytic leukemia*, CLL) signifikant reduziert (Calin et al. 2002). Weitere Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass diese miRNAs in CLL-Zellen die BCL-2 mRNA inhibieren, welche für ein anti-apoptotisches Protein codiert (s. Abschnitt 1.6) (Cimmino et al. 2005). Auf diese Weise wirken miR-15 und miR-16 der Tumorentwicklung durch die Vermittlung von Apoptose entgegen (Jovanovic und Hengartner 2006). Die Expression beider miRNAs ist in LPS-aktivierten Makrophagen ebenfalls reduziert (s. Abbildung 3.2 rechts). Auch miR-155 ist neben ihrer entscheidenden, regulatorischen Rolle während der inflammatorischen Antwort, in die Tumorentwicklung (Kluiver et al. 2005; O'Connell et al. 2008; Faraoni et al. 2009) und in die Apoptose involviert. Untersuchungen haben beispielsweise gezeigt, dass die Induktion der miR-155 in MCF-7 Zellen mit einer gesteigerten Zellproliferation und reduziertem Zelltod korreliert. Dies geschieht vermutlich durch die Inhibierung der TP53INP1 mRNA, welche für einen Tumorrepressor kodiert (Zhang et al. 2013). In Jurkat Zellen konnte beobachtet werden, dass die Inhibierung der miR-155 die Zellviabilität vermindert und zur Induktion von Apoptose führt (Alizadeh et al. 2014). Ferner zeigten Mäuse denen ein miR-155 Inhibitor verabreicht wurde, aufgrund von unterdrückter Zellproliferation und induzierter Apoptose, ein verringertes Tumorwachstum (Zheng et al. 2013). Diese Ergebnisse sowie die Daten der hier vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass miR-155 während der Entzündungsreaktion in RAW 264.7 Zellen eine protektive Funktion ausübt, indem die miRNA durch die post-transkriptionale Regulation der CASP-3 mRNA den Zelltod der Makrophagen verzögert.

4.5.1 Zur Funktion der miR-155 in der Kontrolle der Apoptose

In murinen Osteoblasten konnte gezeigt werden, dass die durch Staurosporin ausgelöste Apoptose, die Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Protease (*caspase-3-like protease*) steigert, was darauf hin deutet, dass SSP den programmierten Zelltod über die Aktivierung der CASP-3 durch einen bislang ungeklärten Mechanismus vermitteln kann (Chae et al. 2000).

Interessanterweise deuten Western Blot Analysen von zytoplasmatischen Extrakten aus LPS- und SSP-behandelten RAW 264.7 Zellen an, dass LPS in den Makrophagen Apoptose verhindert, da in diesen Zellen eine verminderte Spaltung des PARP-1 Proteins detektiert werden konnte (s. Abbildung 3.21). PARP-1 ist an der DNA-Reparatur beteiligt und wird durch DNA-Strangbrüche aktiviert (Burkle 2001). In apoptotischen Zellen wird PARP-1 als Substrat der aktiven CASP-3 jedoch gespalten, wobei das 89 kDa große Spaltprodukt eine deutlich reduzierte katalytische Aktivität aufweist (Soldani und Scovassi 2002; Scovassi und Diederich 2004). Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend, macht die Bestimmung der CASP-3 Aktivität in diesen zytoplasmatischen Extrakten deutlich, dass die in den SSP-behandelten Makrophagen detektierte, hohe Aktivität der Protease aufgrund der vorherigen LPS-Stimulation deutlich reduziert ist (s. Abbildung 3.22). Dies ist auf eine verringerte Synthese der CASP-3 zurückzuführen. Aufgrund der gemeinsamen Substratspezifität der aktiven CASP-3 und CASP-7, detektiert der genutzte Assay die enzymatische Aktivität beider Caspasen. Da im Western Blot gezeigt werden konnte, dass in RAW 264.7 Zellen CASP-7 deutlich geringer exprimiert wird als CASP-3 (Daten nicht gezeigt), kann davon ausgegangen werden, dass die Aktivität der CASP-3 gemessen wurde.

Die durchflusszytometrische Analyse von APC-Annexin V und 7-AAD gefärbten RAW 264.7 Zellen, die vor der SSP-Behandlung mit LPS aktiviert wurden, bestätigt die Hypothese, dass LPS den Eintritt der Makrophagen in die Apoptose zu gehen, verzögert (s. Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24). Dies geschieht höchstwahrscheinlich durch die miR-155-vermittelte Reduktion der CASP-3 mRNA (s. Abbildung 3.21). Deutlicher wird dies noch infolge der Inhibierung der miR-155 durch Transfektion der RAW 264.7 Zellen mit antagomir-155. In Makrophagen, die vor der SSP-Behandlung mit LPS stimuliert wurden, steigt der prozentuale Anteil der Annexin V positiven Zellen im Vergleich zu antagomir-122-transfizierten RAW 264.7 Zellen (s. Abbildung 3.28), was daraufhin deutet, dass die Inhibierung der miR-155 den protektiven Effekt der LPS-anhängigen miR-155 Induktion aufhebt.

Wie obenstehend beschrieben, ist in LPS-aktivierten Makrophagen neben den inflammatorischen Zyotkinen und Chemokinen auch die Expression von anti-apoptotischen Genen wie ciap2 induziert, welche die Resistenz der Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli erhöht und ihre Funktion im inflammatorischen Milieu aufrecht erhält (Manna und Aggarwal 1999; Conte et al. 2006). Verschiedene Studien zeigten, dass LPS eine induzierte Apoptose in Makrophagen verhindern kann (Islam et al. 2006; Tsolmongyn et al. 2013), wobei eine Beteiligung von LPS-aktivierten miRNAs nicht untersucht wurde. Untersuchungen zur Sepsis in Tiermodellen sowie Autopsien von Patienten, die an einer Sepsis und/oder Multiorganversagen verstarben, zeigten, dass durch Sepsis ein Apoptose-bedingter Verlust von B- und T-Lymphozyten erfolgt (Hotchkiss et

al. 2001). Dies könnte eine Ursache für die immunsuppressive Phase der Sepsis und dem oft damit verbundenen Tod der Patienten darstellen (s. Abschnitt 1.1.4) (Lang und Matute-Bello 2009). Auf der einen Seite wird durch Apoptosemechanismen die Zellhomöostase während einer inflammatorischen Antwort, z.B. durch die Eliminierung von autoreaktiven Immunzellen, sichergestellt. Auf der anderen Seite führt aber die unkontrollierte Apoptose von Immunzellen dazu, dass die Fähigkeit des Wirts eindringende Pathogene zu bekämpfen, verschlechtert wird (Hotchkiss et al. 2001; Luan et al. 2015).

Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle während der Initiation, Aufrechterhaltung und der Einstellung der inflammatorischen Antwort des Wirts (Wynn et al. 2013). Eine exzessive Apoptose der Zellen kann aufgrund eines geschwächten Immunsystems das Risiko von sekundären Infektionen erhöhen (Hotchkiss et al. 2001; Hotchkiss und Nicholson 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass während der durch die sechsstündige LPS-Stimulation ausgelösten Entzündungsreaktion in Makrophagen die Apoptose der Zellen verhindert wird (s. Abbildung 3.21 und Abbildung 3.23). Zu dem hier untersuchten Zeitpunkt scheint die LPS-induzierte miR-155 durch die Modulation der CASP-3 mRNA zur Kontrolle der Apoptose und somit zur Aufrechterhaltung der inflammatorischen Antwort, beizutragen. Eine kürzlich veröffentliche Studie zeigte, dass in humanen Monozyten, die mit dem *Mycobacterium tuberculosis* infiziert wurden, miR-155 die Apoptose der Zellen durch die Inhibierung der FOXO3 (*forkehead box O3*) mRNA unterdrückt (Huang et al. 2015). Diese kodiert für einen Transkriptionsfaktor welcher pro-apoptotische Gene aktiviert (Burgering und Medema 2003). Weiterhin stellt FADD (*Fas-associated death domain protein*) eine validierte miR-155 Ziel-mRNA dar (Tili et al. 2007; Wang et al. 2011). Es wurde nachgewiesen, dass die miR-155-abhängige Herunterregulation des Adaptorproteins des Fas-Rezeptor zur Abnahme einer LDL-induzierten Apoptose in RAW 264.7 Zellen beiträgt (Zhu et al. 2013).

4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit dokumentierten Ergebnisse weisen nach, dass miR-155 die Expression zweier Ziel-mRNAs durch unterschiedliche post-transkriptionale Regulationsmechanismen beeinflusst. Es ist dabei noch nicht geklärt, welche zellulären Signale dazu führen, dass eine Ziel-mRNA translational inhibiert oder abgebaut wird. In weiteren Untersuchungen sollte analysiert werden, ob IKKε mRNA zu einem späteren Zeitpunkt als CASP-3 mRNA degradiert wird oder ob mit Abnahme der LPS-Stimulation die IKKε mRNA wieder polyadenyliert und somit reaktiviert wird (s. Abschnitt 4.4) (Muddashetty et al. 2011; Wilczynska und Bushell 2015). Es wäre interessant, im

Zuge eines LPS-Zeitreihenexperiments in *in vitro* Translationsassays zu untersuchen, ob und zu welchem Zeitpunkt eine mögliche Destabilisierung der IKKε mRNA stattfindet.

Im Falle der miR-155-vermittelten Destabilisierung der CASP-3 mRNA könnte untersucht werden, ob dieser regulatorische Effekt in RAW 264.7 Zellen auch zu einem späteren Zeitpunkt bzw. bei erhöhter SSP-Konzentration noch zu beobachten ist. Es kann vermutet werden, dass bei andauernder LPS-Stimulation bzw. bei einer exzessiven Immunantwort dieser Regulationsmechanismus nicht mehr greift, da der Wirtsorganismus keinen Nutzen mehr davon hat, die Funktion der Makrophagen aufrecht zu erhalten. Das Ausmaß bzw. der zeitliche Verlauf einer Entzündungsreaktion könnte darüber entscheiden, ob der Eintritt in die Apoptose oder das Überleben der Zellen günstiger ist.

4.7 Zur Isolierung von zirkulierenden miRNAs in humanem Serum

Sepsis ist eine der häufigsten Todesursachen auf den Intensivstationen deutscher Krankenhäuser (Engel et al. 2007). Infolge von Infektionen, Verbrennungen oder Traumata kann sich aus einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) eine Sepsis und im schlimmsten Fall eine schwere Sepsis bzw. ein septischer Schock entwickeln. Eine der Herausforderungen in der Behandlung einer Sepsis liegt in der frühzeitigen Diagnose, also der schnellen Unterscheidung zwischen SIRS und einer sich entwickelnden Sepsis (Ma et al. 2013; Tacke et al. 2014). Zurzeit sind die in der Klinik am häufigsten genutzten Biomarker PCT, CRP und IL-6, wobei die geringe Selektivität und Spezifität dieser Marker ein Problem darstellen (Dumache et al. 2015). Im Plasma oder Serum zirkulierende miRNAs wurden kürzlich als potentielle Biomarker für die Sepsis-Diagnose beschrieben, wobei es an standardisierten Verfahren zur Expressionsanalyse dieser extrazellulären miRNAs mangelt (Benz et al. 2016).

In dieser Arbeit wurden Vorexperimente zur Isolierung von zirkulierenden miRNAs aus humanem Serum durchgeführt. Die Präparation der miRNAs erfolgte zunächst aus dem Serum von gesunden Freiwilligen mittels eines kommerziell erhältlichen Kits und die Expressionsanalyse ausgewählter miRNAs erfolgte durch qPCR. Als interner Standard wurde den Proben zuvor eine definierte Menge miR-39 aus *C. elegans* hinzugefügt. Die zur Analyse von miRNAs aus Zellen verwendete U6 snRNA eignet sich nicht zur Normalisierung der miRNA Expression, da auch für U6 sRNA krankheitsspezifische Schwankungen in der Expression festgestellt wurden (Benz et al. 2013). Aus diesem Grund sollten vorangegangene Studien, in denen zirkulierenden miRNAs als Biomarker für bestimmte Krankheitsbilder untersucht wurden, weiter validiert werden. Anhand der C_T-Werte der hier untersuchten zirkulierenden miRNAs ist ersichtlich, dass die miRNAs im Serum von gesunden Probanden unterschiedlich abundant sind (s. Abbildung 3.30A). Beispielsweise weist

miR-4772-5p-iso, eine Isoform der miR-4772-5p, den höchsten C_T-Wert auf (C_T = 34), das heißt das Signal dieser miRNA ist erst relativ spät über dem Hintergrundsignal detektierbar und liegt somit am Rande der Nachweisgrenze der qPCR (Caraguel et al. 2011). (Ma et al. 2013) konnte zeigen, dass miR-4772-5p-iso im Serum von septischen Patienten hochreguliert ist und die Expressionslevel der miRNA eine Unterscheidung zwischen Sepsis und SIRS zulässt (Ma et al. 2013). Allerdings wurden in dieser Studie nur die C_T-Werte der miRNA dargestellt, welche sowohl in gesunden Probanden als auch in SIRS- und Sepsis-Patienten relativ hoch sind. Eine relative Expression durch die Normalisierung über einen internen Standard wurde nicht berechnet. In einem weiteren Experiment in dieser Arbeit zeigte sich, dass sich die Expressionslevel von miR-150 und miR-146a im Serum von gesunden weiblichen und gesunden männlichen Freiwilligen nicht unterscheiden (s. Abbildung 3.30B), so dass für eine größere angelegte Studie, Serumproben beider Geschlechter als gesunde Kontrollen genutzt werden könnten. Die Expressionsanalyse von miR-150 und miR-146a im Serum von Patienten mit SIRS und septischen Patienten zeigte eine deutliche Reduktion beider miRNAs im Vergleich zu gesunden Freiwilligen, die in den Serumproben von Tag 3 nach der Sepsisdiagnose am stärksten ausgeprägt ist (s. Abbildung 3.31).

4.7.1 Ausblick

Erste Erkenntnisse, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, sollten weiter verifiziert werden. Vier miRNAs, darunter miR-146a und miR-24, die in dieser Arbeit durch Hochdurchsatzsequenzierung identifiziert wurden (s. Abbildung 3.2) sowie zwei weitere miRNAs, miR-150 (Vasilescu et al. 2009) und miR-223 (Wang et al. 2010), die als zirkulierende miRNAs in der Literatur im Zusammenhang mit Sepsis beschrieben wurden, sollten dabei weiter untersucht werden. Die Expressionslevel der miRNAs sollten im Serum von chirurgischen Patienten mit SIRS (1 Tag post-OP) sowie im Serum von septischen Patienten am Tag der Sepsis-Diagnose und an Tag 3 nach Diagnose bestimmt werden. Ein standardisiertes Protokoll zur miRNA-Isolierung ist notwendig, um präparationsbedingte Schwankungen in der späteren miRNA-Expressionsanalyse auszuschließen. Obwohl miRNAs im Serum und Plasma relativ stabil zirkulieren (Mitchell et al. 2008), sollte bei der Isolierung, neben der exogenen *spike-in* Kontrolle cel-miR-39, den Proben ein RNase-Inhibitor hinzugefügt werden, um einen enzymatischem Abbau auszuschließen (s. Abbildung 3.31). Die Expressionslevel der miRNAs und ihr Potential als mögliche Sepsis-Biomarker sollten im Zusammenhang mit den diagnostischen Klinikparametern der individuellen Patienten, wie z.B. PCT, CRP und IL-6 aber auch mit den Leber- und Nierenwerte, untersucht werden. Mögliche bzw. unterschiedliche Vorerkrankungen der Patienten können die miRNA Expression beeinflussen.

4.8 Zur Sekretion von miRNAs in Mikrovesikeln

Zirkulierende miRNAs sind entweder in extrazellulären Vesikeln, wie Exosomen, Mikrovesikeln oder apoptotischen Körperchen (Bala et al. 2015) verpackt oder mit Komponenten des miRISC, wie Ago2 assoziiert (Arroyo et al. 2011). Auf diese Weise sind die in einer Vielzahl von Körperflüssigkeiten zirkulierenden miRNAs, z.B. im Serum oder Plasma, vor enzymatischem Abbau geschützt (Mitchell et al. 2008).

Es wurden erste Versuche zur Isolation von Exosomen aus den Kulturüberständen unbehandelter und LPS-aktivierter RAW 264.7 Zellen durchgeführt und untersucht, ob ausgewählte miRNAs in Exosomen enthalten sind. Da die Expression von miR-146a (Taganov et al. 2006) und miR-155 in den Makrophagen infolge einer LPS-Stimulation ansteigt (s. Abbildung 3.2, links und Abbildung 3.3), wurden diese beiden miRNAs für die Analyse genutzt. Exosomen haben eine Größe von ca. 40-100 nm und tragen spezifische Markerproteine, zu denen u.a. CD63 zählt (Lee et al. 2012; Hulsmans und Holvoet 2013). Im Western Blot kann CD63 detektiert werden (s. Abbildung 3.32A), was eine erfolgreiche Präparation von Exosomen aus unbehandelten und LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen zeigt. Anders als im RAW 264.7 Zelllysat scheinen dabei in den isolierten Exosomen zwei der drei vorkommenden Isoformen von CD63 vorzukommen. Studien weisen daraufhin, dass Komponenten des miRISC die Beladung der Exosomen mit miRNAs kontrollieren können. Neben dem in Exosomen stark angereicherten Protein GW182 (Gibbings et al. 2009), konnte auch Ago2 in Exosomen aus humanen Monozyten nachgewiesen werden, jedoch in geringerem Maß als in Gesamtzellpräparaten (Zhang et al. 2010). Der Nachweis von Ago2 in den in dieser Arbeit isolierten Exosomen-Fraktionen aus RAW 264.7 Zellen, war in den Vorversuchen noch nicht eindeutig möglich (s. Abbildung 3.32A). Die Analyse der RNA aus isolierten Exosomen aus unbehandelten und LPS-stimulierten Makrophagen weist miR-155 und miR-146a in Exosomen nach. Die qPCR Ergebnisse zeigen, dass in Exosomen aus LPS-aktivierten Makrophagen beide miRNAs im Vergleich zu Exosomen aus unbehandelten Zellen angereichert sind (s. Abbildung 3.32C und D).

Die Fähigkeit von Zellen, mit benachbarten Zellen zu kommunizieren bildet die Grundlage für die koordinierte Aktivität eines multizellulären Organismus. Neben direktem Zell-Zell-Kontakt (*cell junctions*) (Singer 1992), löslichen parakrinen oder autokrinen Molekülen (Singh und Harris 2005), sind sezernierte miRNAs durch den Transport in Mikrovesikeln an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt. Sezernierte miRNAs sind in der Lage, nach ihrer Entlassung in Mikrovesikeln aus einer Donor-Zelle die Expression einer Rezipienten-Zelle zu beeinflussen (Chen et al. 2012). Eine kürzlich veröffentliche Studie der Arbeitsgruppe um O'Connell hat gezeigt, dass miR-155 und miR-146a in dendritischen Zellen in Exosomen verpackt, sezerniert und von dendritischen Rezipienten-Zellen

aufgenommen werden (Alexander et al. 2015). In den Rezipienten-Zellen assoziieren die miRNAs mit Ago2 und modulieren die inflammatorische Reaktion durch die post-transkriptionale Inhibierung ihrer Ziel-mRNAs SHIP1 (O'Connell et al. 2009), BACH1 (Skalsky et al. 2007) (miR-155) sowie IRAK1 und TRAF6 (Taganov et al. 2006) (miR-146a) (Alexander et al. 2015). Auf diesen Eigenschaften basierend, ließen sich Exosomen für die Therapie von Krankheiten nutzen. Aufgrund ihrer physiologischen Abstammung können Exosomen als nicht-immunogene *Carrier* von Medikamenten verwendet werden. In Exosomen verpackte miRNAs könnten dabei z.B. gewebespezifisch die Expression ihrer Ziel-mRNAs inhibieren (De Toro et al. 2015).

4.8.1 Ausblick

Es wäre interessant, in nachfolgenden Experimenten die Funktion der von LPS-aktivierten Makrophagen in Exosomen verpackten miR-155 detaillierter zu analysieren. Dabei könnte untersucht werden, inwiefern die sezernierte miR-155 aus LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen in der Lage wäre, in unstimulierten Makrophagen die Expression von Ziel-mRNAs post-transkriptional zu modulieren. Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen bieten sich Untersuchungen zur CASP-3 mRNA Stabilität in Rezipienten-Zellen an, welche mit Exosomen aus LPS-stimulierten Makrophagen inkubiert wurden. Dies kann durch Anwendung von Luciferase Reporter mRNAs durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob in unbehandelten RAW 264.7 Zellen, in denen miR-155 kaum exprimiert wird (s. Abbildung 3.2 links und Tabelle 15), eine direkte Interaktion der exogenen miR-155 und CASP-3 mRNA stattfindet. Ferner kann in weiteren Experimenten untersucht werden, ob durch die Inkubation von Exosomen aus LPS-aktivierten Makrophagen mit unbehandelten Zellen, die Tendenz dieser Zellen nach SSP-Behandlung in die Apoptose zu gehen, abnimmt. Weiterhin wäre es interessant, die Zellkulturversuche in einem Mausmodell fortzuführen, um zu untersuchen, ob die sezernierte miR-155 nach Injektion in miR-155$^{-/-}$ oder TLR4$^{-/-}$-Mäuse auch *in vivo* in der Lage ist, eine Entzündungsreaktion zu regulieren.

Des Weiteren ist noch ungeklärt, wie die Selektion sezernierter miRNAs erfolgt und wie diese zu sezernierende miRNAs in den Donor-Zellen für den Transport in Exosomen markiert werden. Erste Hinweise deuten daraufhin, dass das RNA-bindende Protein hnRNPA2B1 spezifische Motive in der miRNA-Sequenz erkennt und in die Beladung der Exosomen mit miRNAs involviert ist (Villarroya-Beltri et al. 2013). Eine andere Studie wies nach, dass in humanen B-Zellen 3'-uridlylierte miRNA Isoformen in Exosomen angereichert sind, während 3'-adenylierte miRNA Isoformen vornehmlich in der Zelle verbleiben (Koppers-Lalic et al. 2014). Durch Sequenzierung der RNA aus isolierten Exosomen und den RAW 264.7 Zellen könnte nach Anreicherungen von 3'-uridlylierten miRNAs gesucht werden.

5 Literatur

Abdul-Careem MF, Lee AJ, Pek EA, Gill N, Gillgrass AE, Chew MV, Reid S, Ashkar AA. 2012. Genital HSV-2 infection induces short-term NK cell memory. *PLoS One* **7**: e32821.

ACCP/SCCM. 1992. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* **20**: 864-874.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783-801.

Alexander C, Rietschel ET. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* **7**: 167-202.

Alexander M, Hu R, Runtsch MC, Kagele DA, Mosbruger TL, Tolmachova T, Seabra MC, Round JL, Ward DM, O'Connell RM. 2015. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun* **6**: 7321.

Alizadeh S, Kaviani S, Soleimani M, Abroun S, Kashani-Khatib Z, Asgharzadeh A, Dargahi H, Mousavi R. 2014. Mir-55 inhibition can reduce cell proliferation and induce apoptosis in Jurkat (Acute T cell Leukemia) cell line. *Iran J Ped Hematol Oncol* **4**: 141-150.

Ameres SL, Zamore PD. 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 475-488.

Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, Doxaki C, Schworer S, Zacharioudaki V, Margioris AN, Tsichlis PN, Tsatsanis C. 2009. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* **31**: 220-231.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* **29**: 1303-1310.

Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T et al. 2006. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* **442**: 203-207.

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL et al. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 5003-5008.

Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**: 1305-1308.

Babski J, Maier LK, Heyer R, Jaschinski K, Prasse D, Jager D, Randau L, Schmitz RA, Marchfelder A, Soppa J. 2014. Small regulatory RNAs in Archaea. *RNA Biol* **11**: 484-493.

Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**: 64-71.

Bala S, Csak T, Momen-Heravi F, Lippai D, Kodys K, Catalano D, Satishchandran A, Ambros V, Szabo G. 2015. Biodistribution and function of extracellular miRNA-155 in mice. *Sci Rep* **5**: 10721.

Balk RA. 2014. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? *Virulence* **5**: 20-26.

Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297.

Bartel DP. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**: 215-233.

Barton DJ, Flanegan JB. 1993. Coupled translation and replication of poliovirus RNA in vitro: synthesis of functional 3D polymerase and infectious virus. *J Virol* **67**: 822-831.

Beitzinger M, Meister G. 2011. Experimental identification of microRNA targets by immunoprecipitation of Argonaute protein complexes. *Methods Mol Biol* **732**: 153-167.

Benz F, Roderburg C, Vargas Cardenas D, Vucur M, Gautheron J, Koch A, Zimmermann H, Janssen J, Nieuwenhuijsen L, Luedde M et al. 2013. U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Exp Mol Med* **45**: e42.

Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. 2016. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *Int J Mol Sci* **17**.

Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. 2007. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* **28**: 328-336.

Boaru SG, Borkham-Kamphorst E, Tihaa L, Haas U, Weiskirchen R. 2012. Expression analysis of inflammasomes in experimental models of inflammatory and fibrotic liver disease. *J Inflamm (Lond)* **9**: 49.

Boldin MP, Baltimore D. 2012. MicroRNAs, new effectors and regulators of NF-kappaB. *Immunol Rev* **246**: 205-220.

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* **270**: 7795-7798.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 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**: 1644-1655.

Borregaard N, Cowland JB. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**: 3503-3521.

Bosmann M, Ward PA. 2013. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol* **34**: 129-136.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Braun J, Huttelmaier S. 2011. Pathogenic mechanisms of deregulated microRNA expression in thyroid carcinomas of follicular origin. *Thyroid Res* **4 Suppl 1**: S1.

Braun JE, Huntzinger E, Fauser M, Izaurralde E. 2011. GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol Cell* **44**: 120-133.

Braun JE, Huntzinger E, Izaurralde E. 2013. The role of GW182 proteins in miRNA-mediated gene silencing. *Adv Exp Med Biol* **768**: 147-163.

Brunkhorst FM. 2006. [Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]. *Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* **41**: 43-44.

Burgering BM, Medema RH. 2003. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol* **73**: 689-701.

Burkle A. 2001. Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays* **23**: 795-806.

Cai ZK, Chen Q, Chen YB, Gu M, Zheng DC, Zhou J, Wang Z. 2015. microRNA-155 promotes the proliferation of prostate cancer cells by targeting annexin 7. *Mol Med Rep* **11**: 533-538.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K et al. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15524-15529.

Caraguel CG, Stryhn H, Gagne N, Dohoo IR, Hammell KL. 2011. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *J Vet Diagn Invest* **23**: 2-15.

Carballo E, Lai WS, Blackshear PJ. 1998. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* **281**: 1001-1005.

Carpenter S, Ricci EP, Mercier BC, Moore MJ, Fitzgerald KA. 2014. Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **14**: 361-376.

Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, Santos MA, Pierre P. 2009. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2735-2740.

Chae HJ, Kang JS, Byun JO, Han KS, Kim DU, Oh SM, Kim HM, Chae SW, Kim HR. 2000. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol Res* **42**: 373-381.

Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. 2010. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* **465**: 584-589.

Chen W, Yan ZH, Wang YM, Xu BY, Deng GH. 2014. Genome-wide microarray-based analysis of miRNAs expression in patients with acute-on-chronic liver failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **13**: 32-39.

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X et al. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* **18**: 997-1006.

Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. 2012. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* **22**: 125-132.

Chen XM, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF. 2007. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against Cryptosporidium parvum infection. *J Biol Chem* **282**: 28929-28938.

Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, Ma E, Mane S, Hannon GJ, Lawson ND et al. 2010. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* **328**: 1694-1698.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M et al. 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13944-13949.

Clement SL, Scheckel C, Stoecklin G, Lykke-Andersen J. 2011. Phosphorylation of tristetraprolin by MK2 impairs AU-rich element mRNA decay by preventing deadenylase recruitment. *Mol Cell Biol* **31**: 256-266.

Cline MJ, Lehrer RI, Territo MC, Golde DW. 1978. UCLA Conference. Monocytes and macrophages: functions and diseases. *Ann Intern Med* **88**: 78-88.

Conte D, Holcik M, Lefebvre CA, Lacasse E, Picketts DJ, Wright KE, Korneluk RG. 2006. Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival. *Mol Cell Biol* **26**: 699-708.

Contreras J, Rao DS. 2012. MicroRNAs in inflammation and immune responses. *Leukemia* **26**: 404-413.

Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. 2011. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* **8**: 467-477.

Creagh EM. 2014. Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. *Trends Immunol* **35**: 631-640.

Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 49-63.

Davis RJ. 1994. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* **19**: 470-473.

De Santis R, Liepelt A, Mossanen JC, Dueck A, Simons N, Mohs A, Trautwein C, Meister G, Marx G, Ostareck-Lederer A et al. 2016. miR-155 targets Caspase-3 mRNA in activated macrophages. *RNA Biol* **13**: 43-58.

De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. 2015. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol* **6**: 203.

de Vries S, Naarmann-de Vries IS, Urlaub H, Lue H, Bernhagen J, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A. 2013. Identification of DEAD-box RNA helicase 6 (DDX6) as a cellular modulator of vascular endothelial growth factor expression under hypoxia. *J Biol Chem* **288**: 5815-5827.

Dennis PP, Omer A. 2005. Small non-coding RNAs in Archaea. *Curr Opin Microbiol* **8**: 685-694.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* **17**: 2215-2223.

Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**: 300-304.

Drenth JP, van der Meer JW. 2006. The inflammasome--a linebacker of innate defense. *N Engl J Med* **355**: 730-732.

Dueck A, Eichner A, Sixt M, Meister G. 2014. A miR-155-dependent microRNA hierarchy in dendritic cell maturation and macrophage activation. *FEBS Lett* **588**: 632-640.

Dueck A, Meister G. 2014. Assembly and function of small RNA - argonaute protein complexes. *Biol Chem* **395**: 611-629.

Dumache R, Rogobete AF, Bedreag OH, Sarandan M, Cradigati AC, Papurica M, Dumbuleu CM, Nartita R, Sandesc D. 2015. Use of miRNAs as biomarkers in sepsis. *Anal Cell Pathol (Amst)* **2015**: 186716.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424.

Eichelbaum K, Krijgsveld J. 2014. Rapid temporal dynamics of transcription, protein synthesis, and secretion during macrophage activation. *Mol Cell Proteomics* **13**: 792-810.

Eichhorn SW, Guo H, McGeary SE, Rodriguez-Mias RA, Shin C, Baek D, Hsu SH, Ghoshal K, Villen J, Bartel DP. 2014. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell* **56**: 104-115.

Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S et al. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* **33**: 606-618.

Fabian MR, Cieplak MK, Frank F, Morita M, Green J, Srikumar T, Nagar B, Yamamoto T, Raught B, Duchaine TF et al. 2011. miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 1211-1217.

Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, Mathys H, Zipprich JT, Svitkin YV, Rivas F, Jinek M, Wohlschlegel J, Doudna JA et al. 2009. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* **35**: 868-880.

Fabian MR, Sonenberg N. 2012. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 586-593.

Fahy RJ, Doseff AI, Wewers MD. 1999. Spontaneous human monocyte apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blocked by endotoxin and is independent of caspase-1. *J Immunol* **163**: 1755-1762.

Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. 2009. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta* **1792**: 497-505.

Femminella GD, Ferrara N, Rengo G. 2015. The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. *Front Physiol* **6**: 40.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature* **391**: 806-811.

Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**: 76-100.

Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**: 491-496.

Foshay KM, Gallicano GI. 2009. miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation. *Dev Biol* **326**: 431-443.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**: 92-105.

Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M. 2009. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov* **8**: 480-499.

Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**: 445-454.

Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. 2009. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* **11**: 1143-1149.

Ginhoux F, Jung S. 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* **14**: 392-404.

Gordon S, Taylor PR. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**: 953-964.

Gottesman S, Storz G. 2011. Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.

Goyal A, Wang Y, Graham MM, Doseff AI, Bhatt NY, Marsh CB. 2002. Monocyte survival factors induce Akt activation and suppress caspase-3. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**: 224-230.

Gray P, Michelsen KS, Sirois CM, Lowe E, Shimada K, Crother TR, Chen S, Brikos C, Bulut Y, Latz E et al. 2010. Identification of a novel human MD-2 splice variant that negatively regulates Lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J Immunol* **184**: 6359-6366.

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* **36**: D154-158.

Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**: 835-840.

Guo J, Kim D, Gao J, Kurtyka C, Chen H, Yu C, Wu D, Mittal A, Beg AA, Chellappan SP et al. 2013. IKBKE is induced by STAT3 and tobacco carcinogen and determines chemosensitivity in non-small cell lung cancer. *Oncogene* **32**: 151-159.

Gurung P, Anand PK, Malireddi RK, Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Dillon CP, Weinlich R, Green DR, Lamkanfi M, Kanneganti TD. 2014. FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *J Immunol* **192**: 1835-1846.

Ha M, Kim VN. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 509-524.

Han J, Pedersen JS, Kwon SC, Belair CD, Kim YK, Yeom KH, Yang WY, Haussler D, Blelloch R, Kim VN. 2009. Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* **136**: 75-84.

Han KJ, Su X, Xu LG, Bin LH, Zhang J, Shu HB. 2004. Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem* **279**: 15652-15661.

Han Z, Hendrickson EA, Bremner TA, Wyche JH. 1997. A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro. *J Biol Chem* **272**: 13432-13436.

Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, Sczakiel G. 2010. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol* **28**: 655-661.

Harvima IT, Levi-Schaffer F, Draber P, Friedman S, Polakovicova I, Gibbs BF, Blank U, Nilsson G, Maurer M. 2014. Molecular targets on mast cells and basophils for novel therapies. *J Allergy Clin Immunol* **134**: 530-544.

Hebert SS, Papadopoulou AS, Smith P, Galas MC, Planel E, Silahtaroglu AN, Sergeant N, Buee L, De Strooper B. 2010. Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* **19**: 3959-3969.

Henriquez-Camacho C, Losa J. 2014. Biomarkers for sepsis. *Biomed Res Int* **2014**: 547818.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* **162**: 3749-3752.

Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **13**: 862-874.

Hotchkiss RS, Nicholson DW. 2006. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* **6**: 813-822.

Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG et al. 2001. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* **166**: 6952-6963.

Huang J, Jiao J, Xu W, Zhao H, Zhang C, Shi Y, Xiao Z. 2015. miR-155 is upregulated in patients with active tuberculosis and inhibits apoptosis of monocytes by targeting FOXO3. *Mol Med Rep*.

Huber M. 2013. Activation/Inhibition of mast cells by supra-optimal antigen concentrations. *Cell Commun Signal* **11**: 7.

Hulsmans M, Holvoet P. 2013. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovasc Res* **100**: 7-18.

Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. 2005. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16961-16966.

Huntzinger E, Izaurralde E. 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* **12**: 99-110.

Huntzinger E, Kuzuoglu-Ozturk D, Braun JE, Eulalio A, Wohlbold L, Izaurralde E. 2013. The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Res* **41**: 978-994.

Hutvagner G, Simard MJ, Mello CC, Zamore PD. 2004. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* **2**: E98.

Imig J, Motsch N, Zhu JY, Barth S, Okoniewski M, Reineke T, Tinguely M, Faggioni A, Trivedi P, Meister G et al. 2011. microRNA profiling in Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma. *Nucleic Acids Res* **39**: 1880-1893.

Ishizu H, Siomi H, Siomi MC. 2012. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes Dev* **26**: 2361-2373.

Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, Ito H, Koide N, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. 2006. Lipopolysaccharide prevents apoptosis induced by brefeldin A, an endoplasmic reticulum stress agent, in RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **340**: 589-596.

Ito K. 2007. Impact of post-translational modifications of proteins on the inflammatory process. *Biochem Soc Trans* **35**: 281-283.

Iwasaki A, Medzhitov R. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* **16**: 343-353.

Izaurralde E. 2015. GENE REGULATION. Breakers and blockers-miRNAs at work. *Science* **349**: 380-382.

Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 113-127.

Jager D, Sharma CM, Thomsen J, Ehlers C, Vogel J, Schmitz RA. 2009. Deep sequencing analysis of the Methanosarcina mazei Go1 transcriptome in response to nitrogen availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 21878-21882.

Janeway CA, Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**: 1-13.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.

Jonas S, Izaurralde E. 2013. The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes Dev* **27**: 2628-2641.

Jonas S, Izzauralde E. 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* **16**: 421-433.

Jovanovic M, Hengartner MO. 2006. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene* **25**: 6176-6187.

Kadl A, Meher AK, Sharma PR, Lee MY, Doran AC, Johnstone SR, Elliott MR, Gruber F, Han J, Chen W et al. 2010. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res* **107**: 737-746.

Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. 2012. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res* **40**: D109-114.

Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**: 373-384.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257.

Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. 2001. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* **276**: 46639-46646.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**: 1132-1136.

Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, Kroesen BJ, van den Berg A. 2005. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* **207**: 243-249.

Kondo M, Weissman IL, Akashi K. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**: 661-672.

Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, van Eijndhoven MA, Sadek P, Sie D, Zini N, Middeldorp JM, Ylstra B, de Menezes RX et al. 2014. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep* **8**: 1649-1658.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* **42**: D68-73.

Krol J, Loedige I, Filipowicz W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* **11**: 597-610.

Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. 2005. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* **438**: 685-689.

Labonte AC, Tosello-Trampont AC, Hahn YS. 2014. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Mol Cells* **37**: 275-285.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Landskroner-Eiger S, Moneke I, Sessa WC. 2013. miRNAs as modulators of angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**: a006643.

Lang JD, Matute-Bello G. 2009. Lymphocytes, apoptosis and sepsis: making the jump from mice to humans. *Crit Care* **13**: 109.

Lanzavecchia A, Sallusto F. 2001. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol* **13**: 291-298.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.

Laskin DL, Weinberger B, Laskin JD. 2001. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J Leukoc Biol* **70**: 163-170.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**: 843-854.

Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ. 2012. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet* **21**: R125-134.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* **86**: 973-983.

Lennox KA, Behlke MA. 2011. Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene Ther* **18**: 1111-1120.

Leung AK, Vyas S, Rood JE, Bhutkar A, Sharp PA, Chang P. 2011. Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm. *Mol Cell* **42**: 489-499.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**: 15-20.

Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. 2002. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5567-5572.

Li T, Morgan MJ, Choksi S, Zhang Y, Kim YS, Liu ZG. 2010. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nat Immunol* **11**: 799-805.

Liepelt A, Mossanen JC, Denecke B, Heymann F, De Santis R, Tacke F, Marx G, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A. 2014. Translation control of TAK1 mRNA by hnRNP K modulates LPS-induced macrophage activation. *RNA* **20**: 899-911.

Lin WW, Karin M. 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* **117**: 1175-1183.

Liu F, Kong X, Lv L, Gao J. 2015. MiR-155 targets TP53INP1 to regulate liver cancer stem cell acquisition and self-renewal. *FEBS Lett* **589**: 500-506.

Liu S, Patel SH, Ginestier C, Ibarra I, Martin-Trevino R, Bai S, McDermott SP, Shang L, Ke J, Ou SJ et al. 2012. MicroRNA93 regulates proliferation and differentiation of normal and malignant breast stem cells. *PLoS Genet* **8**: e1002751.

Liu Y, Chen Q, Song Y, Lai L, Wang J, Yu H, Cao X, Wang Q. 2011. MicroRNA-98 negatively regulates IL-10 production and endotoxin tolerance in macrophages after LPS stimulation. *FEBS Lett* **585**: 1963-1968.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.

Lombardo E, Alvarez-Barrientos A, Maroto B, Bosca L, Knaus UG. 2007. TLR4-mediated survival of macrophages is MyD88 dependent and requires TNF-alpha autocrine signalling. *J Immunol* **178**: 3731-3739.

Long L, Yu P, Liu Y, Wang S, Li R, Shi J, Zhang X, Li Y, Sun X, Zhou B et al. 2013. Upregulated microRNA-155 expression in peripheral blood mononuclear cells and fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol* **2013**: 296139.

Lu F, Weidmer A, Liu CG, Volinia S, Croce CM, Lieberman PM. 2008. Epstein-Barr virus-induced miR-155 attenuates NF-kappaB signaling and stabilizes latent virus persistence. *J Virol* **82**: 10436-10443.

Lu LF, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, Loeb GB, Lee H, Yoshimura A, Rajewsky K et al. 2009. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* **30**: 80-91.

Luan YY, Yao YM, Xiao XZ, Sheng ZY. 2015. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. *J Interferon Cytokine Res* **35**: 17-22.

Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. 2011. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol* **3**: 159-166.

Ma Y, Vilanova D, Atalar K, Delfour O, Edgeworth J, Ostermann M, Hernandez-Fuentes M, Razafimahatratra S, Michot B, Persing DH et al. 2013. Genome-wide sequencing of cellular microRNAs identifies a combinatorial expression signature diagnostic of sepsis. *PLoS One* **8**: e75918.

Malyshev I, Malyshev Y. 2015. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage "Switch" Phenotype. *Biomed Res Int* **2015**: 341308.

Mandal A, Viswanathan C. 2015. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* **8**: 47-55.

Manna SK, Aggarwal BB. 1999. Lipopolysaccharide inhibits TNF-induced apoptosis: role of nuclear factor-kappaB activation and reactive oxygen intermediates. *J Immunol* **162**: 1510-1518.

Martinez FO, Gordon S. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* **6**: 13.

Martinez FO, Helming L, Gordon S. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* **27**: 451-483.

Martinez NJ, Gregory RI. 2013. Argonaute2 expression is post-transcriptionally coupled to microRNA abundance. *RNA* **19**: 605-612.

Martins LM, Kottke TJ, Kaufmann SH, Earnshaw WC. 1998. Phosphorylated forms of activated caspases are present in cytosol from HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *Blood* **92**: 3042-3049.

Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS et al. 2007. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* **317**: 1764-1767.

Meister G. 2013. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet* **14**: 447-459.

Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T. 2004. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* **10**: 544-550.

Metz M, Maurer M. 2007. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol* **28**: 234-241.

Mica L, Harter L, Trentz O, Keel M. 2004. Endotoxin reduces CD95-induced neutrophil apoptosis by cIAP-2-mediated caspase-3 degradation. *J Am Coll Surg* **199**: 595-602.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A et al. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10513-10518.

Mitra SA, Mitra AP, Triche TJ. 2012. A central role for long non-coding RNA in cancer. *Front Genet* **3**: 17.

Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwieg EA, Yuan J. 1993. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3. *Cell* **75**: 653-660.

Mizuno T. 1984. [Regulation of gene expression by a small RNA transcript (micRNA): osmoregulation in E. coli]. *Seikagaku* **56**: 113-119.

Moretti F, Kaiser C, Zdanowicz-Specht A, Hentze MW. 2012. PABP and the poly(A) tail augment microRNA repression by facilitated miRISC binding. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 603-608.

Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**: 958-969.

Muddashetty RS, Nalavadi VC, Gross C, Yao X, Xing L, Laur O, Warren ST, Bassell GJ. 2011. Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. *Mol Cell* **42**: 673-688.

Murphy, Janeway CA, Jr., Travers P, Walport M, Mowat A, Weaver CT. 2012. *Janeways's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, Abingdon.

Nahid MA, Satoh M, Chan EK. 2011. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol* **8**: 388-403.

Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, Akhtar S, Zhou Z, Koenen RR, Heyll K, Gremse F, Kiessling F, Grommes J et al. 2012. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *J Clin Invest* **122**: 4190-4202.

Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ. 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28**: 239-242.

Ng SL, Friedman BA, Schmid S, Gertz J, Myers RM, Tenoever BR, Maniatis T. 2011. IkappaB kinase epsilon (IKK(epsilon)) regulates the balance between type I and type II interferon responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 21170-21175.

O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. 2009. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 7113-7118.

O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, Kahn ME, Rao DS, Baltimore D. 2010. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* **33**: 607-619.

O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. 2012. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* **30**: 295-312.

O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Boldin MP, Taganov KD, Nicoll J, Paquette RL, Baltimore D. 2008. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* **205**: 585-594.

O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. 2007. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1604-1609.

O'Hara SP, Splinter PL, Gajdos GB, Trussoni CE, Fernandez-Zapico ME, Chen XM, LaRusso NF. 2010. NFkappaB p50-CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta)-mediated transcriptional repression of microRNA let-7i following microbial infection. *J Biol Chem* **285**: 216-225.

O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. 2011. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **11**: 163-175.

Ohta S, Bahrun U, Tanaka M, Kimoto M. 2004. Identification of a novel isoform of MD-2 that downregulates lipopolysaccharide signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **323**: 1103-1108.

Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* **11**: 305-312.

Pall GS, Hamilton AJ. 2008. Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc* **3**: 1077-1084.

Pan Q, Guo C, Sun C, Fan J, Fang C. 2014. Integrative analysis of the transcriptome and targetome identifies the regulatory network of miR-16: an inhibitory role against the activation of hepatic stellate cells. *Biomed Mater Eng* **24**: 3863-3871.

Parihar A, Eubank TD, Doseff AI. 2010. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *J Innate Immun* **2**: 204-215.

Park BS, Lee JO. 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med* **45**: e66.

Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. 2009a. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**: 1191-1195.

Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. 2009b. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* **15**: 5473-5477.

Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. 2013. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**.

Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grasser FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M et al. 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* **2**: 269-276.

Polikepahad S, Knight JM, Naghavi AO, Oplt T, Creighton CJ, Shaw C, Benham AL, Kim J, Soibam B, Harris RA et al. 2010. Proinflammatory role for let-7 microRNAS in experimental asthma. *J Biol Chem* **285**: 30139-30149.

Porter AG, Janicke RU. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**: 99-104.

Prasse D, Thomsen J, De Santis R, Muntel J, Becher D, Schmitz RA. 2015. First description of small proteins encoded by spRNAs in Methanosarcina mazei strain Go1. *Biochimie*.

Quinn SR, O'Neill LA. 2011. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *Int Immunol* **23**: 421-425.

Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ. 1996. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* **16**: 1247-1255.

Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* **11**: 753-761.

Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* **15**: 261-267.

Roberts TC, Coenen-Stass AM, Wood MJ. 2014. Assessment of RT-qPCR normalization strategies for accurate quantification of extracellular microRNAs in murine serum. *PLoS One* **9**: e89237.

Roderburg C, Luedde M, Vargas Cardenas D, Vucur M, Scholten D, Frey N, Koch A, Trautwein C, Tacke F, Luedde T. 2013. Circulating microRNA-150 serum levels predict survival in patients with critical illness and sepsis. *PLoS One* **8**: e54612.

Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* **16**: 6914-6925.

Ruckdeschel K, Pfaffinger G, Haase R, Sing A, Weighardt H, Hacker G, Holzmann B, Heesemann J. 2004. Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. *J Immunol* **173**: 3320-3328.

Ruest LB, Khalyfa A, Wang E. 2002. Development-dependent disappearance of caspase-3 in skeletal muscle is post-transcriptionally regulated. *J Cell Biochem* **86**: 21-28.

Russell JH, Ley TJ. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**: 323-370.

Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)* **84**: 901-910.

Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. 1992. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* **13**: 204-208.

Schoggins JW, Rice CM. 2011. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* **1**: 519-525.

Schulte LN, Westermann AJ, Vogel J. 2013. Differential activation and functional specialization of miR-146 and miR-155 in innate immune sensing. *Nucleic Acids Res* **41**: 542-553.

Scovassi IA, Diederich M. 2004. Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem Pharmacol* **68**: 1041-1047.

Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. 2015. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* **22**: 526-539.

Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, Johnson DS, Chen Y, O'Neill LA. 2010. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol* **11**: 141-147.

Shimada T, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Inoue J, Tatsumi Y, Kanamaru A, Akira S. 1999. IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol* **11**: 1357-1362.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* **189**: 1777-1782.

Sica A, Mantovani A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* **122**: 787-795.

Singer SJ. 1992. Intercellular communication and cell-cell adhesion. *Science* **255**: 1671-1677.

Singh AB, Harris RC. 2005. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* **17**: 1183-1193.

Siomi H, Siomi MC. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* **457**: 396-404.

Skalsky RL, Samols MA, Plaisance KB, Boss IW, Riva A, Lopez MC, Baker HV, Renne R. 2007. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J Virol* **81**: 12836-12845.

Smale ST, Natoli G. 2014. Transcriptional control of inflammatory responses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**: a016261.

Soldani C, Scovassi AI. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* **7**: 321-328.

Sridharan P, Chamberlain RS. 2013. The efficacy of procalcitonin as a biomarker in the management of sepsis: slaying dragons or tilting at windmills? *Surg Infect (Larchmt)* **14**: 489-511.

Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Kyburz D. 2008. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **58**: 1001-1009.

Storz G, Vogel J, Wassarman KM. 2011. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* **43**: 880-891.

Storz G, Wolf YI, Ramamurthi KS. 2014. Small proteins can no longer be ignored. *Annu Rev Biochem* **83**: 753-777.

Stripecke R, Hentze MW. 1992. Bacteriophage and spliceosomal proteins function as position-dependent cis/trans repressors of mRNA translation in vitro. *Nucleic Acids Res* **20**: 5555-5564.

Su YQ, Sugiura K, Woo Y, Wigglesworth K, Kamdar S, Affourtit J, Eppig JJ. 2007. Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* **302**: 104-117.

Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* **31**: 318-324.

Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. 1997. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol* **17**: 6274-6282.

Swearingen KE, Loomis WP, Zheng M, Cookson BT, Dovichi NJ. 2010. Proteomic profiling of lipopolysaccharide-activated macrophages by isotope coded affinity tagging. *J Proteome Res* **9**: 2412-2421.

Tacke F. 2009. [Monocyte subpopulations in inflammation processes: principles and perspectives]. *Dtsch Med Wochenschr* **134**: 1645-1648.

Tacke F, Roderburg C, Benz F, Cardenas DV, Luedde M, Hippe HJ, Frey N, Vucur M, Gautheron J, Koch A et al. 2014. Levels of circulating miR-133a are elevated in sepsis and predict mortality in critically ill patients. *Crit Care Med* **42**: 1096-1104.

Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12481-12486.

Takeda K, Akira S. 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* **16**: 3-9.

Tam W. 2001. Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene* **274**: 157-167.

Tan X, Gao Y, Nan Y, Zhang J, Di C, Wang X, Lian F, Cao Y, Hu Y, Xu L et al. 2015. Cellular MicroRNA Let-7a Suppresses KSHV Replication through Targeting MAP4K4 Signaling Pathways. *PLoS One* **10**: e0132148.

Tan Y, Kagan JC. 2014. A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide. *Mol Cell* **54**: 212-223.

Tang B, Xiao B, Liu Z, Li N, Zhu ED, Li BS, Xie QH, Zhuang Y, Zou QM, Mao XH. 2010. Identification of MyD88 as a novel target of miR-155, involved in negative regulation of Helicobacter pylori-induced inflammation. *FEBS Lett* **584**: 1481-1486.

Tauber AI. 2003. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 897-901.

Thermann R, Hentze MW. 2007. Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* **447**: 875-878.

Thomas ED, Ramberg RE, Sale GE, Sparkes RS, Golde DW. 1976. Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science* **192**: 1016-1018.

Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456-1462.

Tiedje C, Kotlyarov A, Gaestel M. 2010. Molecular mechanisms of phosphorylation-regulated TTP (tristetraprolin) action and screening for further TTP-interacting proteins. *Biochem Soc Trans* **38**: 1632-1637.

Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Calin GA et al. 2007. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* **179**: 5082-5089.

Tsang WP, Kwok TT. 2008. Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3. *Apoptosis* **13**: 1215-1222.

Tsolmongyn B, Koide N, Odkhuu E, Haque A, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T, Yokochi T. 2013. Lipopolysaccharide prevents valproic acid-induced apoptosis via activation of nuclear factor-kappaB and inhibition of p53 activation. *Cell Immunol* **282**: 100-105.

Ulloa L, Tracey KJ. 2005. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med* **11**: 56-63.

Umemura N, Saio M, Suwa T, Kitoh Y, Bai J, Nonaka K, Ouyang GF, Okada M, Balazs M, Adany R et al. 2008. Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *J Leukoc Biol* **83**: 1136-1144.

Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. 2006. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* **34**: 1996-2003.

Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, Nicoloso MS, Barbarotto E, Popa M, Stanciulea O et al. 2009. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One* **4**: e7405.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**: 39-51.

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* **13**: 423-433.

Villarroya-Beltri C, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Cabo F, Perez-Hernandez D, Vazquez J, Martin-Cofreces N, Martinez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F. 2013. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* **4**: 2980.

von Roretz C, Lian XJ, Macri AM, Punjani N, Clair E, Drouin O, Dormoy-Raclet V, Ma JF, Gallouzi IE. 2013. Apoptotic-induced cleavage shifts HuR from being a promoter of survival to an activator of caspase-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* **20**: 154-168.

Voss OH, Batra S, Kolattukudy SJ, Gonzalez-Mejia ME, Smith JB, Doseff AI. 2007. Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation. *J Biol Chem* **282**: 25088-25099.

Wahle E, Winkler GS. 2013. RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 561-570.

Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**: 346-351.

Wang H, Meng K, Chen W, Feng D, Jia Y, Xie L. 2012a. Serum miR-574-5p: a prognostic predictor of sepsis patients. *Shock* **37**: 263-267.

Wang HJ, Zhang PJ, Chen WJ, Feng D, Jia YH, Xie LX. 2012b. Four serum microRNAs identified as diagnostic biomarkers of sepsis. *J Trauma Acute Care Surg* **73**: 850-854.

Wang HQ, Yu XD, Liu ZH, Cheng X, Samartzis D, Jia LT, Wu SX, Huang J, Chen J, Luo ZJ. 2011. Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3. *J Pathol* **225**: 232-242.

Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, Wan XJ, Zhu KM. 2010. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun* **394**: 184-188.

Wang N, Ahmed S, Haqqi TM. 2005. Genomic structure and functional characterization of the promoter region of human IkappaB kinase-related kinase IKKi/IKKvarepsilon gene. *Gene* **353**: 118-133.

Wang N, Liang H, Zen K. 2014. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* **5**: 614.

Wang Z. 2010. MicroRNA: A matter of life or death. *World J Biol Chem* **1**: 41-54.

Weischenfeldt J, Porse B. 2008. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc* **2008**: pdb prot5080.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. *Cell* **75**: 855-862.

Wilczynska A, Bushell M. 2015. The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ* **22**: 22-33.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* **11**: 228-234.

Witkos TM, Koscianska E, Krzyzosiak WJ. 2011. Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr Mol Med* **11**: 93-109.

Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. 2010. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* **49**: 1618-1631.

Wu E, Thivierge C, Flamand M, Mathonnet G, Vashisht AA, Wohlschlegel J, Fabian MR, Sonenberg N, Duchaine TF. 2010. Pervasive and cooperative deadenylation of 3'UTRs by embryonic microRNA families. *Mol Cell* **40**: 558-570.

Wu SC, Yang JC, Rau CS, Chen YC, Lu TH, Lin MW, Tzeng SL, Wu YC, Wu CJ, Hsieh CH. 2013. Profiling circulating microRNA expression in experimental sepsis using cecal ligation and puncture. *PLoS One* **8**: e77936.

Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**: 445-455.

Xiao B, Liu Z, Li BS, Tang B, Li W, Guo G, Shi Y, Wang F, Wu Y, Tong WD et al. 2009. Induction of microRNA-155 during Helicobacter pylori infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. *J Infect Dis* **200**: 916-925.

Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, De Nardo D, Gohel TD, Emde M, Schmidleithner L et al. 2014. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* **40**: 274-288.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K et al. 2003a. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**: 640-643.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. 2003b. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* **4**: 1144-1150.

Yu XF, Zou J, Bao ZJ, Dong J. 2011. miR-93 suppresses proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World J Gastroenterol* **17**: 4711-4717.

Zekri L, Huntzinger E, Heimstadt S, Izaurralde E. 2009. The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Mol Cell Biol* **29**: 6220-6231.

Zhang CM, Zhao J, Deng HY. 2013. MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *J Biomed Sci* **20**: 79.

Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X et al. 2010. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* **39**: 133-144.

Zheng SR, Guo GL, Zhai Q, Zou ZY, Zhang W. 2013. Effects of miR-155 antisense oligonucleotide on breast carcinoma cell line MDA-MB-157 and implanted tumors. *Asian Pac J Cancer Prev* **14**: 2361-2366.

Zhu GF, Yang LX, Guo RW, Liu H, Shi YK, Wang H, Ye JS, Yang ZH, Liang X. 2013. miR-155 inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of RAW264.7 cells. *Mol Cell Biochem* **382**: 253-261.

Ziegler-Heitbrock HW. 2000. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* **67**: 603-606.

6 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ABD	AGO binding domain
ADP	Adenosindiphosphat
AGO	Argonaute Protein
AKT	thymoma viral proto-oncogene
APAF-1	apoptotic protease-activating factor 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	AU-rich element
ATP	Adenosintriphosphat
AUF1	AU-rich element RNA-binding protein 1
BAK	BCL-2-antagonist/killer
BAX	BCL-2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BMDM	bone marrow-derived macrophages
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
BSA	bovines Serumalbumin
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CD	cluster of differentiation
CDK6	cyclin-dependent kinase 6
ciap2	cellular inhibitor of apoptosis 2
C_T	cycle threshold
DC	Dendritische Zellen
DCP	mRNA-decapping enzyme
DDX6	DEAD box helicase 6
DED	death effector domain
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
DMEM	Dulbecco's modifed eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
(d)NTP	(Desoxy-) Ribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dT	Desoxyribothymidin
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
eRF	eukaryotic release factor
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FCS	fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GW182	glycine tryptophan repeat containing protein of 182 kDa
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HRP	horseradish peroxidase
Hsp	heat shock protein

HuR	human antigen R
IFN	Interferon
IκB	Inhibitor of NF-κB
IKK	IκB Kinase
IKKε	inhibitor of κB kinase epsilon
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IRAK1	IL-1 receptor-associated kinase
IRF	interferon regulatory factor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JUN	Jun oncogene
LBP	LPS-binding protein
lncRNAs	long noncoding RNAs
LPS	Lipopolysaccharide
LUC	Luciferase
m7G	5' 7-methyl guanosine nucleotide cap
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MD-2	myeloid differentiation factor 2
miRISC	miRNA-induced silencing complex
miRNA, miR	mikroRNA
MK2	MAPK-activated protein kinase 2
MKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MPP	multipotential progenitor
MYD88	myeloid di_erentiation primary response protein 88
NDUFV1	nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase (ubiquinone) avoprotein 1
NEMO	NFκB essential modulator
NF-κB	nuclear factor κB
NK	natural killer
nt	Nukleotid(e)
ORF	open reading frame
PABP	poly(A) binding protein
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PAN	poly(A) specific ribonuclease subunit
PARP-1	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1
PARP-4	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 4
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PDCD4	programmed cell death protein 4
P-body	processing body
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
Pi	anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIK3CA	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PIP3	Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonyluorid
PNK	Polynukleotidkinase
ProT	Prothymosin α
PRR	pattern recognition receptor
RBP	RNA-bindendes Protein

RIP1	receptor-interacitng serine-threonine kinase 1
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	Ribonukleotidprotein
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SD	silencing domain
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SIRS	systemic inammatory response syndrome
snRNA	small nuclear RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
ss	einzelsträngig
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TAB	TAK1-bindendes Protein
TAK1	TGF-β activated kinase 1
TBK1	TRAF family member-associated NF-_B activator-binding kinase 1
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	transforming growth factor -β
TIAR	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1
TIRAP	toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein
TLR	toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing IFN-β
tRNAi	Initiator-tRNA
TRBP	human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein
TRP53BP2	transformation related protein 53 binding protein 2
TTP	Tristetraprolin
U	Unit
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolette Strahlung
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
XRN1	5'-3' Exoribonuklease 1
z.B.	zum Beispiel

Klonierungsstrategien

Tabelle Anhang 1 Klonierungsstrategien der verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Klonierungsstrategie
pBSIIKS(+)-LUC-Traf6 3'UTR	504 bp der TRAF6 3'UTR wurden mit den Primern Traf6 3'UTR Pst1_for und Traf6 3'UTR Xho1_rev mittels PCR aus cDNA von unbehandelten RAW 264.7 amplifiziert. Der parentale Vektor pBSIIKS(+)-LUC wurde *Pst1*/*Xho1* geschnitten, gereinigt und mit dem PCR-Produkt ligiert, welches durch die Primer bereits *Pst1* bzw. *Xho1* Schnittstellen besaß
pBSIIKS(+)-LUC-Traf6 3'UTR mut1	Als Ausgangsvektor wurde pBSIIKS(+)-LUC-Traf6 3'UTR verwendet. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde mit den Primern miR-146 mut1_for und miR-146 mut1_rev 4 nt in der ersten miR-146 Bindestelle in der TRAF6 3'UTR substituiert.
pBSIIKS(+)-LUC-Traf6 3'UTR mut2	Als Ausgangsvektor wurde pBSIIKS(+)-LUC-Traf6 3'UTR mut1 verwendet. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde mit den Primern miR-146 mut2_for und miR-146 mut2_rev 4 nt in der zweiten miR-146 Bindestelle in der TRAF6 3'UTR substituiert.
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-Traf6 3'UTR	Der Vektor wurde wie pBSIIKS(+)-LUC-Traf6 3'UTR kloniert. Der Ausgangsvektor war hier pBSIIKS(+)-LUC-poly(A).
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-Traf6 3'UTR mut1	Als Ausgangsvektor wurde pBSIIKS(+)-LUC-poly(A) Traf6 3'UTR verwendet. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde mit den Primern miR-146 mut1_for und miR-146 mut1_rev 4 nt in der ersten miR-146 Bindestelle in der TRAF6 3'UTR substituiert.
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-Traf6 3'UTR mut2	Der Vektor pBSIIKS(+)-LUC-Traf6 3'UTR mut2 wurde mittels *Xho1* und *Pst1* geschnitten, um die Traf6 3'UTR mit den zwei mutierten miR-146 Bindestellen zu erhalten. Diese wurde mit dem *Xho1*/*Pst1* geschnittenem Vektor pBSIIKS(+)-LUC-poly(A) ligiert.
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-Casp-3 3'UTR	466 bp der CASP-3 3'UTR wurden mit den Primern Casp-3 3'UTR_for und Casp-3 3'UTR_rev mittels PCR aus cDNA von unbehandelten RAW 264.7 amplifiziert. Der Vektor pBSIIKS(+)-LUC-poly(A) IKKε 3'UTR wurde mittels *Xho1* und *Pst1* geschnitten, gereinigt und mit dem PCR-Produkt ligiert, welches durch die Primer bereits *Pst1* bzw. *Xho1* Schnittstellen besaß.
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-Casp-3 3'UTR mut	Als Ausgangsvektor wurde pBSIIKS(+)-LUC-poly(A) Casp-3 3'UTR verwendet. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde mit den Primern Casp-3 mut2_for und Casp-3 mut2_rev 4 nt in der miR-155 Bindestelle in der CASP-3 3'UTR substituiert.
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-IKKε 3'UTR	464 bp der IKKε 3'UTR wurden mit den Primern IKKε 3'UTR_for und IKKε 3'UTR_rev mittels PCR aus cDNA von unbehandelten RAW 264.7 amplifiziert. Der parentale Vektor pBSIIKS(+)-LUC-poly(A) wurde *Pst1*/*Xho1* geschnitten, gereinigt und mit dem PCR-Produkt ligiert, welches durch die Primer bereits *Pst1* bzw. *Xho1* Schnittstellen besaß.
pBSIIKS(+)-LUC-poly(A)-IKKε 3'UTR mut	Als Ausgangsvektor wurde pBSIIKS(+)-LUC-poly(A) IKKε 3'UTR verwendet. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde mit den Primern IKKε mut_for und IKKε mut_rev 4 nt in der miR-155 Bindestelle in der CASP-3 3'UTR substituiert.

Alle Plasmide tragen ein Ampicillin-Resistenzgen.

Inkubationsbedingungen der Antikörper

Tabelle Anhang 2 Inkubationsbedingungen der im Western Blot verwendeten Antikörper

Antigen	Blocken	Primärantikörper	Sekundärantikörper
α-TUBULIN	5 % Milch/TBST	1:5000	anti-Maus 1:5000
Ago2	5 % BSA + 1 % milk/TBST	1:500 5 % BSA + 1 % milk/TBST üN 4 °C	anti-Maus 1:2000
CASPASE-3/cleaved CASPASE-3[1]	5 % Milch/TBST	1:200	anti-Maus 1:2000
CASPASE-3[2]	5 % Milch/TBS + 0,1 % Tween-20	1:1000 5 % Milch/TBS + 0,1 % Tween-20 üN 4 °C	anti-Kaninchen 1:2000
CD63	1x Roti®-Block/TBS + 0,1 % Tween-20	1:200 1x Roti®-Block/TBS + 0,1 % Tween-20 üN 4 °C	anti-Kaninchen 1:2000
ERK1/2	5 % BSA/TBST	1:1000 5 % BSA/TBST üN 4 °C	anti-Kaninchen 1:5000
GAPDH	5 % Milch/TBST	1:5000	anti-Maus 1:5000
IKKε	5 % BSA/TBS + 0,1 % Tween-20	1:1000 5 % BSA/TBS + 0,1 % Tween-20 üN 4 °C	anti-Kaninchen 1:1000
p38	5 % Milch/PBST	1:200 5 % Milch/PBST üN 4 °C	anti-Kaninchen 1:5000
PARP-1	5 % Milch/TBST	1:1000 5 % BSA/TBST üN 4 °C	anti-Kaninchen 1:2000
phospho-ERK 1/2	5 % BSA/TBST	1:1000 5 % BSA/TBST üN 4 °C	anti-Kaninchen 1:5000
phospho-p38	5 % BSA/TBS + 0,1 % Tween-20	1:2000 5 % BSA/TBS + 0,1 % Tween-20 üN 4 °C	anti-Maus 1:2000
TAB2	5 % Milch/TBST	1:500	anti-Ziege 1:1000
TRAF6	5 % Milch/TBST	1:200 üN 4°C	anti-Maus 1:1000
VINCULIN	5 % Milch/TBST	1:3000	anti-Maus 1:2000

üN (über Nacht), [1]Santa-Cruz [2]Cell Signaling (s. Tabelle 12). Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Primärantikörper in 5 % Milch/TBST 1 h bei RT inkubiert und die Sekundärantikörper im gleichen Diluent verdünnt, wie der zuvor verwendete Primärantikörper.

Relative Sequenzierhäufigkeit ausgewählter miRNA Kandidaten

Tabelle Anhang 3 Relative Sequenzierhäufigkeit der miRNAs mit erhöhter Expression in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen mit ≤ 30 *reads*

ID	0h	6h	*x-fache Änderung*
miR-21 5'arm	32,093	54,289	1,7
miR-99a 5'arm	1,419	1,439	1,0
miR-92a 3'arm	2,295	5,064	2,2
miR-222 3'arm	0,479	2,823	5,9
miR-221 3'arm	0,603	2,355	3,9
miR-22 3'arm	0,143	0,193	1,3
miR-27a 3'arm	0,726	1,178	1,6
miR-25 3'arm	1,056	1,149	1,1
miR-181a 5'arm	0,767	1,123	1,5
miR-142 5'arm	0,252	0,329	1,3
miR-99b 5'arm	0,278	0,529	1,9
miR-151 5'arm	0,115	0,132	1,1
miR-146b 5'arm	0,177	0,681	3,8
miR-148b 3'arm	0,331	0,352	1,1
miR-181b 5'arm	0,199	0,329	1,7
miR-146a 5'arm	0,008	0,033	4,1
let-7e 5'arm	0,033	0,099	3
miR-423 3'arm	0,083	0,114	1,4
miR-19b 3'arm	0,147	0,2	1,4
miR-29b 3'arm	0,077	0,102	1,3
miR-186 5'arm	0,089	0,122	1,4
miR-15a 5'arm	0,068	0,147	2,2
miR-139 5'arm	0,06	0,078	1,3
miR-155 5'arm	0,004	0,163	40,8
miR-301a 3'arm	0,077	0,144	1,9
miR-193 3'arm	0,004	0,007	1,8
miR-125a 5'arm	0,011	0,04	3,6
miR-361 5'arm	0,017	0,028	1,6
miR-1944 3'arm	0,012	0,023	1,9
miR-342 5' arm	0,001	0,008	8
miR-350 3'arm	0,012	0,015	1,3
miR-132 3'arm	0,004	0,014	3,5
miR-301b 3'arm	0,011	0,019	1,7
miR-365 3'arm	0,005	0,008	1,6
miR-362 5'arm	0,005	0,008	1,7
miR-194 5'arm	0,004	0,014	3,3
miR-328 3'arm	0,007	0,008	1,2
miR-326 3'arm	0,005	0,006	1,2
miR-212 3'arm	0,002	0,006	3
miR-188 5'arm	0,001	0,003	2,1
miR-1964 3'arm	0,001	0,003	3

Grau hinterlegt sind die miRNAs die für Northern Blot und qPCR Experimente ausgewählt wurden.

Tabelle Anhang 4 Relative Sequenzierhäufigkeit der miRNAs mit reduzierter Expression in LPS-aktivierten RAW 264.7 Zellen mit ≤ 30 *reads*

ID	0h	6h	*x-fache Änderung*
let-7c 5'arm	3,741	1,933	1,9
let-7f 5'arm	3,391	2,549	1,3
let-7a 5'arm	2,115	0,795	2,7
let-7b 5'arm	0,549	0,486	1,1
miR-30d 5'arm	2,211	0,996	2,2
miR-378 3'arm	4,375	1,747	2,5
miR-24 3'arm	4,172	1,622	2,6
miR-191 5'arm	1,523	1,033	1,5
let-7i 5'arm	2,389	1,438	1,7
miR-30e 5'arm	3,318	0,602	5,5
miR-30a 5'arm	2,364	0,538	4,4
let-7d 5'arm	0,857	0,379	2,3
miR-29a 3'arm	2,751	1,792	1,5
miR-103 3'arm	1,830	0,593	3,1
miR-140 3'arm	2,641	0,729	3,6
miR-93 5'arm	3,727	0,729	5,1
miR-17 5'arm	2,395	0,416	5,8
miR-7a 5'arm	1,267	0,593	2,1
miR-27b 3'arm	0,846	0,787	1,1
miR-16 5'arm	0,878	0,403	2,2
miR-182 5'arm	0,998	0,252	4,0
miR-183 5'arm	0,634	0,282	2,2
miR-20a 5'arm	1,496	0,446	3,4
miR-23a 3'arm	0,487	0,402	1,2
miR-320 3'arm	0,120	0,097	1,2
miR-106b 5'arm	0,664	0,367	1,8
miR-125b 5'arm	0,265	0,243	1,1
let-7g 5'arm	0,423	0,133	3,2
miR-101b 3'arm	0,557	0,286	1,9
miR-15b 5'arm	0,137	0,085	1,6
miR-130b 3'arm	0,199	0,128	1,6
miR-26b 5'arm	0,134	0,076	1,8
miR-26a 5'arm	0,152	0,096	1,6
miR-425 5'arm	0,118	0,092	1,3
miR-30c 5'arm	0,219	0,121	1,8
miR-23b 3'arm	0,129	0,111	1,2
miR-107 3'arm	0,157	0,068	2,3
miR-674 3'arm	0,116	0,05	2,3
miR-10a 5'arm	0,121	0,096	1,3
miR-1198-5p 3'arm	0,055	0,049	1,1
miR-744 5'arm	0,030	0,021	1,4
miR-210 3'arm	0,171	0,040	4,3
miR-98 5'arm	0,073	0,017	4,3
miR-872 5'arm	0,070	0,048	1,4
miR-18a 5'arm	0,160	0,068	2,4
miR-340 5'arm	0,079	0,032	2,5
miR-1839 5'arm	0,031	0,015	2,1
miR-96 5'arm	0,058	0,031	1,9

ID	0h	6h	*x-fache Änderung*
miR-30b 5'arm	0,167	0,040	4,1
miR-532 5'arm	0,095	0,066	1,4
miR-185 5'arm	0,042	0,015	2,8
miR-19a 3'arm	0,070	0,052	1,3
miR-374 5'arm	0,032	0,019	1,7
miR-101a 3'arm	0,097	0,067	1,4
miR-501 3'arm	0,013	0,010	1,3
miR-339 5'arm	0,043	0,024	1,8
miR-1981 5'arm	0,014	0,010	1,4
miR-1937b 3'arm	0,008	0,003	2,4
miR-128 3'arm	0,012	0,011	1,1
miR-652 3'arm	0,034	0,027	1,2
miR-200c 3'arm	0,013	0,007	2,0
miR-322 5'arm	0,015	0,013	1,2
miR-33 5'arm	0,056	0,014	3,9
miR-28 5'arm	0,006	0,004	1,8
miR-3068 5'arm	0,026	0,009	2,8
miR-32 5'arm	0,022	0,014	1,6
miR-199b 3'arm	0,005	0,004	1,1
miR-141 3'arm	0,032	0,009	3,4
miR-700 3'arm	0,006	0,005	1,2
miR-664 5'arm	0,005	0,003	1,6
miR-1937a 3'arm	0,003	0,001	3,9
miR-503 5'arm	0,014	0,009	1,5
miR-720 3'arm	0,003	0,001	2,7
miR-582 3'arm	0,008	0,005	1,6
miR-192 5'arm	0,021	0,007	3,2
miR-542 3'arm	0,011	0,007	1,6
miR-450b 5'arm	0,008	0,004	2
miR-877 5'arm	0,012	0,005	2,4
miR-1843 5'arm	0,004	0,003	1,3
miR-152 3'arm	0,01	0,005	2
miR-450a 5'arm	0,015	0,004	3,8
miR-223 5'arm	0,005	0,001	5
miR-34a 5'arm	0,006	0,001	3,8
miR-187 3'arm	0,002	0,001	1,5

Grau hinterlegt sind die miRNAs die für Northern Blot und qPCR Experimente ausgewählt wurden.

Publikationsliste

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Diplomarbeit: „Identifizierung und Charakterisierung nicht-kodierender RNAs in *Methanosarcina mazei* Stamm Gö1 unter Sauerstoffstress“. (2011)

Susanti D, Wong JH, Vensel WH, Loganathan U, **De Santis R**, Schmitz RA, Balsera M, Buchanan BB, Mukhopadhyay B: *Thioredoxin targets fundamental processes in a methane-producing archaeon, Methanocaldococcus jannaschii*. Proc Natl Acad Sci USA (2014) (IF 9,809)

Liepelt A, Mossanen JC, Denecke B, Heymann F, **De Santis R**, Tacke F, Marx G, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A: *Translation control of TAK1 mRNA by hnRNP K modulates LPS-induced macrophage activation*. RNA (2014) (IF 4,622)

Prasse D, Thomsen J, **De Santis R**, Muntel J, Becher D, Schmitz RA: *First description of small peptides encoded by spRNAs in Methanosarcina mazei strain Gö1*. Biochimi (2015) (IF 3.123)

Martin L, Schmitz S, **De Santis R**, Dömming S, Haase H, Hoeger J, Heinbockel L, Brandenburg K, Marx G, Schuerholz T: *Peptide 19-2.5 inhibits heparan sulfate-triggered inflammation in murine cardiomyocytes stimulated with human sepsis serum*. PLOS one (2015) (IF 3.534)

De Santis R, Liepelt A, Mossanen JC, Dueck A, Simons N, Mohs A, Trautwein C, Meister G, Marx G, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH: *MiR-155 targets CASPASE-3 mRNA in LPS-activated macrophages*. RNA Biology (2016) (IF 4,974)

Martin L, **De Santis R**, Koczera P, Simons N, Haase H, Heinbockel L, Brandenburg K, Marx G, Schuerholz T: *The synthetic antimicrobial peptide 19-2.5 interacts with heparanase and heparan sulfate in murine and human sepsis.* PLOS one (2015) (IF 3.534)

Posterbeiträge

Tag der medizinischen Forschung: Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung (IZKF) der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen (30.11.2012)
Rebecca De Santis, Anke Liepelt, Jana C. Kloos, Antje Ostareck-Lederer and Dirk H. Ostareck
„Characterization of miRNAs as modulators of TLR4-mediated MAPK signaling”

EMBO Conference Series:
The Non-Coding Genome, EMBL, Heidelberg (09.10.-12.10.2013)
Rebecca De Santis, Anke Liepelt, Jana C. Mossanen, Anne Dueck, Gunter Meister, Antje Ostareck-Lederer and Dirk H. Ostareck
„Identification and functional analysis of miRNAs in response to bacterial LPS"

Tag der medizinischen Forschung: Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung (IZKF) der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen (29.11.2013)
Rebecca De Santis, Anke Liepelt, Jana C. Mossanen, Antje Ostareck-Lederer and Dirk H. Ostareck
„Identification and functional analysis of miRNAs in response to bacterial LPS"

Deutscher Anästhesiecongress (DAC):
Leipzig (08.05. - 10.05.2014)
Rebecca De Santis, Anke Liepelt, Jana C. Mossanen, Anne Dueck, Gunter Meister, Antje Ostareck-Lederer, Dirk H. Ostareck und Gernot Marx
„Die anti-apoptotische Funktion von miR-155 in LPS-aktivierten Makrophagen"

Kongress der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung von für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI): Hamburg (03.12. - 05.12.2014)
Rebecca De Santis, Anke Liepelt, Jana C. Mossanen, Anne Dueck, Gunter Meister, Antje Ostareck-Lederer, Dirk H. Ostareck und Gernot Marx
„Analyse der anti-apoptotische Funktion von miR-155 in LPS-aktivierten Makrophagen"

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

De Santis R, Liepelt A, Mossanen JC, Dueck A, Simons N, Mohs A, Trautwein C, Meister G, Marx G, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH (2016). *MiR-155 targets CASPASE-3 mRNA in LPS-activated macrophages*. RNA Biol. 13 (1) 43-58

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Antje Ostareck-Lederer und Prof. Dirk Ostareck, die es mir ermöglicht haben, in ihrer Arbeitsgruppe meine Dissertation zu diesem interessanten Thema anzufertigen, sowie für die stetige Unterstützung während der gesamten Promotion.

Ich danke Prof. Michael Huber und Prof. Ralph Panstruga für die Bereitschaft, meine Dissertation zu begutachten.

Ich möchte mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Experimentellen Arbeitsgruppe Intensivmedizin für die stets kooperative und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Anke Liepelt, Nadine Simons, Dr. Jana Mossanen und Dr. Isabel Naarmann-de Vries.

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Gernot Marx und PD Tobias Schürholz für die Bereitstellung der Serum-Proben und die Unterstützung im letzten Jahr der Promotion.

Dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung während der ersten drei Jahre meiner Promotion bedanken. Der Graduiertenförderung der RWTH Aachen danke ich für die Abschlussfinanzierung meiner Promotion.

Ich bedanke mich bei Dr. Anne Dueck, Prof. Gunter Meister und Dr. Michaela Beitzinger für die experimentelle Hilfe zu Beginn des miRNA Projekts sowie für hilfreiche Tipps zur Ago2 Immunopräzipitation und RNA Transfektion.

Mein Dank gilt Prof. Christian Trautwein und Antje Mohs für die Bereitstellung sowie die Genotypisierung der $TLR4^{-/-}$ Mäuse.

Prof. Frank Tacke danke ich für die Möglichkeit, das Durchflusszytometer zu nutzen.

Ich danke Dr. Jörg Vervoorts-Weber und Prof. Bernhard Lüscher für die Möglichkeit, das Isotopenlabor zu nutzen, sowie PD Ralf Hausmann und Uschi Schneider für die Möglichkeit, die Geräte für die Northern Blot Detektion zu benutzen.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden, die mir eine unvergessliche Zeit in Aachen beschert und mich ein Stück des Weges begleitet haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Judith für die fortwährende Unterstützung und das grenzenlose Vertrauen.

Schließlich möchte ich mich bei Jörg bedanken für die aufmunternden und anspornenden Worte sowie für den nicht zu bezwingenden Optimismus.