

Zusammenfassung

Bei chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA) trägt die Akkumulation proinflammatorischer Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems im entzündeten Gewebe zur Persistenz und Immunpathologie der jeweiligen Erkrankung bei. Diese Akkumulation entsteht durch erhöhte Zellinfiltration, reduzierte Apoptose aber auch durch die Retention der Zellen innerhalb des betroffenen Gewebes. Zu diesen Zellen zählen u.a. proinflammatorische T Helfer 1 (Th1) Gedächtniszellen, charakterisiert durch eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors (TF) TWIST1 und des Zytokins IFN γ . Die molekularen Mechanismen, die zur Retention dieser Zellen im entzündeten Gewebe führen, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der microRNA-31 (miR-31) in proinflammatorischen Th1-Zellen untersucht und dabei ein Mechanismus identifiziert, durch den die allgemeine Motilität dieser Zellen reduziert wird. Dies könnte wiederum die Retention derartiger Zellen im entzündeten Gewebe begünstigen und so zur Persistenz der Erkrankung beitragen.

Es zeigte sich, dass die Expression der miR-31 in mehrfach aktivierten, murinen Th1-Zellen spezifisch erhöht ist. Dabei handelt es sich um ein *in vitro* Modell für proinflammatorische Th1-Zellen. Dementsprechend wiesen auch T-Gedächtniszellen aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA eine erhöhte Expression der miR-31 auf. Für die Identifikation potentieller miR-31 Targetgene wurde eine neue Methode etabliert. Diese kombiniert die herkömmliche *in silico* Targetidentifikation mit der Genexpression im untersuchten Zelltyp und der physischen Präsenz von miRNA Bindestellen im 3'-UTR der potentiellen Targets. Nach Antagomir-induzierter Inhibition der miR-31 konnte anschließend mit Hilfe von Transkriptomanalysen eine erhöhte Expression von 92 identifizierten potentiellen miR-31 Targets nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich in einer Netzwerkanalyse, dass die miR-31 Targets funktionell mit Faktoren verschiedener Signalkaskaden verknüpft sind, die ausgehend vom T-Zell-Rezeptor, den Chemokinrezeptoren und den Integrinen die Umgestaltung des Aktinzytoskeletts und somit die Bewegung der Zellen induzieren. Dementsprechend stieg die Migrationsfähigkeit mehrfach aktivierter Th1-Zellen nach Inhibition der miR-31 *in vitro* signifikant an.

Nachdem der Transkriptionsstartpunkt und die Promoterregion der miR-31 identifiziert wurden, konnten unter Verwendung von CD4 + T-Zellen aus T-bet defizienten Mäusen der TF T-bet und das Zytokin IFN γ als positiv-Regulatoren der miR-31 in Th1-Zellen ermittelt werden. Durch Inhibitions- und Überexpressionsexperimente wurde darüber hinaus der TF FOXO1 als negativ-Regulator identifiziert. Die Überexpression von FOXO1 unter Th1-Bedingungen erhöhte zudem die Expression von *Klf2* und *Sell* (CD62L) und verringerte die Expression von *Cd69*. Interessanterweise stehen diese Faktoren direkt oder über die Regulation weiterer Oberflächenmoleküle (CCR7 und S1PR1) mit der Einwanderung von T-Zellen in sekundäre lymphatische Gewebe und der Retention im entzündeten Gewebe in Verbindung. Das identifizierte regulatorische Netzwerk begünstigt demnach potentiell die Retention proinflammatorischer Th1-Zellen, indem zum einen die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle und zum anderen die Umgestaltung des Aktinzytoskeletts und so die allgemeine Motilität der Zellen reduziert werden.

Insgesamt leistet diese Arbeit somit einen wesentlichen Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle von proinflammatorischen Th1-Zellen im Kontext chronisch entzündlicher Erkrankungen. Der erstmals beschriebene Mechanismus bietet zudem verschiedene Ansatzpunkte für spezifische therapeutische Interventionen, um derartige Zellen zu mobilisieren und so der Akkumulation im entzündeten Gewebe und der jeweiligen Erkrankungen entgegenzuwirken.

Abstract

In chronic inflammatory autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis (RA), pro-inflammatory innate and adaptive immune cells accumulate within the inflamed tissue and contribute to the persistence and the immunopathology of the disease. Cell accumulation is a consequence of increased cell infiltration, reduced apoptosis and retention within the tissue. Among others, these cells include pro-inflammatory type 1 T helper (Th1) cells, characterized by the expression of the transcription factor (TF) TWIST1 and the hallmark cytokine IFN γ . However, the underlying molecular mechanisms eliciting immune cell retention are not fully understood.

By investigating the role of microRNA-31 (miR-31) in repeatedly activated Th1 cells, we identified a mechanism, which reduces cell motility and might be linked to the retention of these cells within the inflamed tissue.

MiR-31 is upregulated in murine Th1 cells with a history of repeated activation, which is an *in vitro* model for pro-inflammatory Th1 cells. In accordance, memory Th cells isolated from the synovial fluid of patients with rheumatic joint disease also express increased levels of miR-31. To identify putative miR-31 targets, we established a novel method for miRNA target identification. This method combines conventional *in silico* target identification with gene expression in the analyzed cell type, as well as the physical presence of miRNA binding sites within the 3'-UTRs. Microarray analysis after antagomir-mediated miR-31 inhibition confirmed an upregulation of 92 identified putative miR-31 targets. Furthermore, network analysis revealed functional connections between these targets and genes associated with the cytoskeletal rearrangement and cell motility downstream of the T-cell receptor, chemokine receptors and integrins. Accordingly, inhibition of miR-31 significantly increased migratory activity of repeatedly activated Th1 cells *in vitro*.

In order to perform a promoter analysis and to identify factors that regulate miR-31 expression in Th1 cells, the transcriptional start site and the promoter region of miR-31 were determined. Afterwards, by using CD4 + T cells isolated from T-bet deficient mice, the TF T-bet and the cytokine IFN γ were shown to enhance miR-31 expression in Th1 cells. In contrast, FOXO1 inhibition and overexpression experiments identified FOXO1 as a negative regulator of miR-31. Overexpression of FOXO1 in Th1 cells also resulted in increased expression of *Klf2* and *Sell* (CD62L) as well as in reduced expression of *Cd69*. Interestingly, by the regulation of additional surface molecules (CCR7 and S1PR1), these factors are directly or indirectly associated with the homing into the secondary lymphoid organs and the retention of T cells within the inflamed tissue. Therefore, the identified regulatory network potentially promotes the retention of pro-inflammatory Th1 cells by affecting the expression of surface molecules and by impairing the rearrangement of the cytoskeleton and cell motility.

In conclusion, this work provides a significant contribution to understand the role of pro-inflammatory Th1 cells in the context of chronic inflammatory diseases. The mechanisms, which are described here for the first time, present the basis for the development of therapeutic strategies to mobilize these cells in order to resolve the inflammation.