

# INHALTSVERZEICHNIS

---

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Zellen des Immunsystems	1
1.2	T-Lymphozyten	3
1.2.1	Subpopulationen von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und ihre Funktionen	4
1.2.2	T-Zellen zirkulieren durch den Körper	6
1.2.3	Migration von T-Zellen durch perivaskuläres Gewebe	7
1.2.4	Transendothelmigration	9
1.3	Zellmigration im Detail	11
1.3.1	Morphologie migrierender T-Zellen	11
1.3.2	Bewegungsmuster und -mechanismen von T-Zellen	12
1.3.3	Die molekulare Maschinerie der Zellmotilität	13
1.3.4	Regulation der Motilität in T-Zellen	15
1.4	Das Immunologische Gedächtnis	18
1.4.1	B- und T-Gedächtniszellen	19
1.4.2	Generierung und Homöostase von CD4 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen	20
1.5	Autoimmunerkrankungen	21
1.5.1	Ursachen für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen	22
1.5.2	Persistenz von Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen	23
1.5.3	Die Rolle der T-Helferzellen bei Autoimmunerkrankungen	24
1.6	MicroRNAs	25
1.6.1	Gene, Biogenese und Reifung von miRNAs	26
1.6.2	Molekulare Mechanismen der miRNA-abhängigen posttranskriptionellen Regulation	29
1.6.3	Modelle der Wirkmechanismen von miRNAs	29
1.6.4	Identifikation der Targets und der biologischen Funktionen von miRNAs	30
1.6.5	MicroRNAs und Autoimmunität	32
1.6.6	MiRNAs in mehrfach aktivierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	33
1.7	Zielsetzung	34
2	MATERIAL	35
2.1	Mäuse	35
2.1.1	Mausstämme	35
2.2	Geräte	36
2.3	Software und Online-Plattformen	37
2.4	Einwegartikel	38
2.5	Kits	39
2.6	Chemikalien und Reagenzien	39
2.7	Puffer und Medien	42

2.8	Plasmide	42
2.9	Antikörper	43
2.10	Oligonukleotide	44
2.10.1	TaqMan <sup>®</sup> -Sonden	44
2.10.2	Primer	45
2.10.3	Antagomire	45
2.10.4	siRNAs	46
3	METHODEN	47
3.1	Humanproben	47
3.2	Allgemeiner Umgang mit den Versuchstieren	47
3.3	Zellbiologische Methoden und Zellkultur	47
3.3.1	Standardkulturbedingungen	47
3.3.2	Isolierung (naïver) T-Helferzellen	47
3.3.3	Isolierung Antigen-präsentierender Zellen	48
3.3.4	T-Helferzell Kulturen	48
3.3.5	Mitogene Zellstimulation mit PMA/Iono	50
3.3.6	Durchflusszytometrie	50
3.3.7	Inhibition von miRNAs durch Antagomire	51
3.3.8	Inhibition von mRNAs durch siRNAs	52
3.3.9	Plasmidamplifikation mit chemisch kompetenten Bakterien	52
3.3.10	Virusherstellung mit HEK293T Zellen	53
3.3.11	Transduktion von T-Helferzellen	53
3.3.12	Adhäsionsversuch	54
3.3.13	Migrationsversuch (Transwell)	55
3.4	Molekularbiologische Methoden	55
3.4.1	RNA Isolation	55
3.4.2	cDNA Synthese	56
3.4.3	quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	57
3.4.4	Sequenzierung und DNA-Microarrays	58
3.5	In silico Analysen	60
3.5.1	Globales miRNA-Expressionsprofil von ein- und mehrfach aktivierter T-Helferzellen	60
3.5.2	Transkriptionsstartpunkt- und Promoteranalyse	60
3.5.3	Identifikation potentieller miR-31 Targets	61
3.5.4	Expressionsanalyse potentieller miR-31 Targets in Th <sub>1</sub> <sub>mfa</sub> -Zellen	61
3.5.5	Target- und Funktionsanalyse nach Inhibition der miR-31 mit Hilfe von GSEA	62
3.5.6	Netzwerkanalyse	63
3.6	Statistik	63
4	ERGEBNISSE	65
4.1	Expressionsprofil der miR-31 in T-Helferzellen	65
4.1.1	Die Expression der miR-31 ist in mehrfach aktivierten Th <sub>1</sub> -Zellen spezifisch erhöht	65

4.1.2	Die Expression der miR <sub>31</sub> ist in Th-Zellen aus Patienten mit rheumatoider Arthritis erhöht	65
4.2	Targetidentifikation und biologische Funktion der miR-31 in Th <sub>1</sub> -Zellen	67
4.2.1	421 potentielle miR-31 Targets konnten in silico identifiziert werden	67
4.2.2	282 der 421 potentiellen miR-31 Targets sind in Th <sub>1_mfa</sub> -Zellen exprimiert - nicht alle enthalten eine miR-31-BS	67
4.2.3	Die Expression der miR-31 in Th <sub>1_mfa</sub> -Zellen kann mit Antagomiren inhibiert werden	69
4.2.4	Transkriptomanalyse nach Inhibition der miR-31	70
4.3	Die miR-31 reduziert die Motilität von Th <sub>1_mfa</sub> -Zellen	77
4.3.1	Die Inhibition der miR-31 erhöht tendenziell die Anzahl adhärenter Th <sub>1_mfa</sub> -Zellen in vitro	77
4.3.2	Die Inhibition der miR-31 erhöht die Anzahl migrierender Th <sub>1_mfa</sub> -Zellen in vitro	78
4.3.3	Inhibition der miR-31 hat keine Auswirkung auf die Expressionslevel von Cxcr3 und Lfa-1	79
4.3.4	Inhibition der miR-31 hat keine Auswirkung auf die Zellzahl und die Zytokinproduktion von Th <sub>1_mfa</sub> -Zellen	80
4.4	Regulation der miR-31 in Th <sub>1</sub> Zellen	82
4.4.1	Die Induktion der miR-31 unter Th <sub>1</sub> -Bedingungen erfolgt ausschließlich nach Aktivierung des TZR/Ko-Rezeptors	82
4.4.2	Die miR-31 Expressionskinetik nach mehrfacher Aktivierung unterscheidet sich von der Kinetik nach der ersten Aktivierung unter Th <sub>1</sub> -Bedingungen	83
4.4.3	Analyse des miR-31 Lokus auf Basis der HDS-Daten aus Th <sub>1_mfa</sub> -Zellen	84
4.4.4	T-bet und IFN $\gamma$ erhöhen die Expression der miR-31 in Th <sub>1</sub> -Zellen	87
4.4.5	TNF $\alpha$ hat keinen Einfluss auf die Expression der miR-31 in Th <sub>1</sub> -Zellen	88
4.4.6	FOXO1 inhibiert die Expression der miR-31 in Th <sub>1</sub> -Zellen und reguliert Faktoren, die das T-Zell-Homing und die Zellmigration beeinflussen	89
4.4.7	TWIST1 hat keinen Einfluss auf die Expression der miR-31 in Th <sub>1</sub> -Zellen	95
5	DISKUSSION	97
5.1	Targetidentifikation und biologische Funktion der miR-31 in Th <sub>1_mfa</sub> -Zellen	98
5.1.1	Targetidentifikation unter Berücksichtigung der mRNA Expression im untersuchten Zelltyp	98
5.1.2	GSEA bestätigen eine verbesserte Vorhersage potentieller Targets und zeigen eine kinetische Komponente bei der Wirkung von miRNAs	99
5.1.3	Die miR-31 beeinflusst die Motilität von Th <sub>1_mfa</sub> -Zellen über ein komplexes Netzwerk von Genen	101
5.1.4	Die Auswirkungen der miR-31 auf die Motilität von Th <sub>1_mfa</sub> -Zellen ergeben sich aus geringen Expressionsänderungen vieler Gene des identifizierten Netzwerks	102
5.1.5	Die Funktion der miR-31 ist stark vom biologischen Kontext abhängig	104

5.2	Regulation der miR-31 in Th <sub>1</sub> - bzw. Th <sub>1<sub>mf</sub>a</sub> -Zellen	105
5.2.1	In CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> T-Zellen ist die miR-31 ein Biomarker für eine mehrfach aktivierte, pathogene Th <sub>1</sub> -Subpopulation	105
5.2.2	Die Induktion der miR-31 erfolgt in T-Zellen ausschließlich durch Aktivierung des TZR und des Ko-Rezeptors CD28	106
5.2.3	In der miR-31 Promoterregion befinden sich funktionelle BS für Th <sub>1</sub> -spezifische Transkriptionsfaktoren	106
5.2.4	Die Expression der miR-31 wird in Th <sub>1</sub> -Zellen durch TF gesteigert, welche durch proinflammatorische Stimuli aktiviert werden	107
5.2.5	FOXO1 beeinflusst die Motilität von Th <sub>1</sub> -Zellen durch Inhibition der miR-31 und der Regulation weiterer Faktoren	108
5.3	Retention und Immobilität von Th <sub>1</sub> -Zellen im entzündeten Gewebe	110
5.4	Potentielle Therapieansätze auf Basis der vorliegenden Studie	112
5.5	Abschließende Bemerkungen und Ausblick	115
A	APPENDIX	117
A.1	Verwendete GSEA Parameter	117
A.2	Genset: Regulation Of Actin Cytoskeleton	118
A.3	Potentielle miR-31 Targets	119
	LITERATUR	123