

CHARAKTERISIERUNG DES EINFLUSSES VON MICRORNAs
AUF DIE T-ZELLANTWORT BEI DER HUMANEN
TUBERKULOSE

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Kerrin Heesch
aus Rendsburg

Hamburg, 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. B. FLEISCHER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Prof. Dr. I. BRUCHHAUS
Tag der Disputation: 14. Dezember 2012

Hamburg, den 29. November 2012



Professor Dr. J. Fromm

Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Kerrin Heesch

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iv
Abstract	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
Danksagung	viii
1 Einleitung	1
1.1 MicroRNAs	1
1.1.1 Biogenese von microRNAs	1
1.1.2 Wirkmechanismus von miRNAs	2
1.1.3 Krankheits-assoziierte miRNAs	5
1.2 Tuberkulose	6
1.2.1 Übertragung und Infektionsverlauf	6
1.2.2 Epidemiologie	7
1.2.3 Diagnose	8
1.2.4 Therapie	9
1.2.5 Problematik der Verbreitung von Tuberkulose	9
1.3 Die Immunantwort bei der Tuberkulose	10
1.3.1 Alveolarmakrophagen	10
1.3.2 Granulombildung	10
1.3.3 Die Rolle der T-Zellantwort	11
1.4 MicroRNAs bei der T-Zellantwort	14
2 Material	16
2.1 Chemikalien und Reagenzien	16
2.2 Spenderzellen	17
2.3 Stimulantien	17
2.4 Monoklonale Antikörper	18
2.5 Medien und Puffer	18
2.5.1 Zellkulturmedien	18
2.5.2 Medien für die Kultur von <i>Escherichia coli</i>	19
2.5.3 Sonstige Lösungen	19

2.6	Enzyme	20
2.7	Oligonukleotide	21
2.8	Plasmide	21
2.9	Kits	22
2.10	Geräte	22
2.11	Verbrauchsmaterial	23
2.12	Software	23
3	Methoden	24
3.1	Probanden und Studie	24
3.2	Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder <i>buffy coat</i>	25
3.3	Bestimmung der Zellzahl	25
3.4	Kryokonservierung von PBMCs	26
3.5	Extrazelluläre Färbung von T-Zellen für die Durchflusszytometrie	26
3.6	Intrazelluläre Färbung von T-Zellen für die Durchflusszytometrie	26
3.7	Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS)	27
3.8	Klonierung miR-29a exprimierender Vektoren	28
3.8.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit KCM	28
3.8.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	28
3.8.3	Amplifikation und Aufreinigung von DNA-Abschnitten	28
3.8.4	Klonierung von miR-29a in LeGO-Vektoren	29
3.9	Exogene Expression von miR-29a durch lentivirale Transduktion	31
3.9.1	Kultur von HEK293T Zellen	32
3.9.2	Generierung lentiviraler Infektionspartikel	33
3.9.3	Transduktion von CD4 ⁺ T-Zellen mit lentiviralen Partikeln	34
3.10	Inhibition der miR-29a Expression mit Hilfe von Antagomirs	35
3.11	Isolation und Analyse von microRNAs	36
3.11.1	Isolation von miRNAs	36
3.11.2	Analyse der miRNA Expression	36
3.11.3	Analyse der pre-miR-29a Expression	38
3.12	Klonierung von T-Zellen mittels Einzelzellsortierung	39
3.13	<i>In vitro</i> Stimulation von primären humanen T-Zellen	40
3.13.1	Kurzzeitstimulation zur Bestimmung des Zytokinprofils (Restimulation)	40
3.13.2	Stimulation zur Bestimmung der miRNA Expressionskinetik	40
3.14	Einzelzellsortierung zur Isolierung von T-Zellsubpopulationen	41
3.15	Statistische Auswertung	41

4	Ergebnisse	42
4.1	Identifizierung und Charakterisierung der miRNA Expression bei der Tuberkulose	42
4.1.1	Analyse der <i>ex vivo</i> miRNA Expression in CD4 ⁺ T-Zellen von nicht-infizierten Kontrollen, LTBI und TB-Patienten	42
4.1.2	Charakterisierung der Expression der Kandidaten-miRNAs in T-Zellen	44
4.2	Identifizierung potentieller Zielgene und Modulation der miRNA-Expression	50
4.2.1	Identifizierung potentieller Zielgene der Kandidaten-miRNAs	50
4.2.2	Initiale Etablierung der stabilen Überexpression von miR-29a mittels eines lentiviralen Systems	52
4.2.3	Etablierung der transienten Inhibition von miR-29a	58
4.3	MiRNAs als Biomarker für die Erkrankung und Behandlung von Tuberkulose	62
4.3.1	<i>Ex vivo</i> Expression der miRNA Kandidaten in CD4 ⁺ T-Zellen von TB-Patienten und Kontaktpersonen aus Ghana	62
4.3.2	<i>Ex vivo</i> Expression der miRNA Kandidaten in CD4 ⁺ T-Zellen von TB-Patienten unter Therapie	63
5	Diskussion	65
5.1	Differentielle miRNA Expression in TB-Patienten und LTBI	65
5.1.1	MiR-21	65
5.1.2	MiR-26a	67
5.1.3	MiR-29a	67
5.1.4	MiR-142-3p	68
5.1.5	Gemeinsame Zielgene der Kandidaten-miRNAs	69
5.1.6	CD4 ⁺ T-Zellen für die miRNA Expressionsanalysen	71
5.2	Expression der Kandidaten-miRNAs bei T-Zellaktivierung, -differenzierung und -polarisierung	71
5.2.1	Expression der Kandidaten-miRNAs in aktivierten T-Zellen	71
5.2.2	Expression der Kandidaten-miRNAs in T-Zellsubpopulationen	72
5.2.3	Expression der Kandidaten-miRNAs in T-Zellklonen mit distinktem Zytokinprofil	72
5.3	Modulation der miRNA Expression in CD4 ⁺ T-Zellen	73
5.4	Unterschiede der miRNA Expression in CD4 ⁺ T-Zellen von TB-Patienten rekrutiert in verschiedenen Ländern	74
5.5	Ausblick	75
6	Anhang	76
6.1	Nukleotidsequenz der pre-miR-29a	76

Zusammenfassung

Bei einer Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *M. tuberculosis* ist die Mehrheit der infizierten Individuen durch Bildung einer spezifischen Immunantwort vor der Entstehung einer aktiven Tuberkulose geschützt. CD4⁺ T-Zellen übernehmen hierbei eine zentrale Rolle. Ein effektiver Immunschutz wird durch IFN γ -sekretierende T_H1-Zellen vermittelt, so dass nur 5 - 10 % der Infizierten im Laufe ihres Lebens eine aktive Tuberkulose entwickeln. Die Ursachen für die Entstehung einer aktiven TB sind im Detail nicht geklärt.

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, nicht-kodierende RNAs, welche über Basenpaarung die Inhibition der Translation oder die Degradierung von mRNA induzieren. MiRNAs regulieren die Funktion von CD4⁺ T-Zellen und sind daher Biomarkerkandidaten für den Schutz gegen eine aktive TB.

In dieser Arbeit sollten miRNAs bezüglich der Rolle bei der Regulation der T-Zellantwort gegenüber einer Infektion mit *M. tuberculosis* untersucht werden. Hierfür wurden TB-Patienten, latent *M. tuberculosis*-Infizierte (LTBI) und nicht *M. tuberculosis*-infizierte Kontrollen in Deutschland rekrutiert. CD4⁺ T-Zellen wurden bezüglich der Expression von 29 vorausgewählte miRNAs analysiert. Dabei wurde eine verminderte Expression von miR-21, miR-26a, miR-29a und miR-142-3p in TB-Patienten verglichen mit LTBI und nicht *M. tuberculosis*-infizierten Kontrollen nachgewiesen. Der Vergleich der Expression der Kandidaten-miRNAs in TB-Patienten und Kontaktpersonen rekrutiert in Ghana ergab dagegen keine differentielle Expression. MiR-26a wurde im Verlauf der Therapie in CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten aus Ghana hochreguliert. Die Expression der identifizierten Kandidaten-miRNAs wurden anschließend in T-Zellsubpopulationen, nach *in vitro* Stimulation naiver T-Zellen und in T-Zellklonen mit distinktem Zytokinprofil charakterisiert. MiR-26a wurde nach T-Zellrezeptor-spezifischer Stimulation naiver T-Zellen herunterreguliert. In T_H17 Klonen stieg die Expression von miR-29a und miR-142-3p nach unspezifischer Stimulation. In T_H1 Klonen dagegen wurde die Expression von miR-26a vermindert. Die Inhibition der Expression von miR-29a über Antagomirs hatte keinen Einfluss auf die Zytokinexpression CD4⁺ T-Zellen. Interessanterweise und entgegen entsprechender Untersuchungen im Tiermodell fand sich keine veränderte IFN γ -Expression nach miR-29a Modulation. Sequenz-basierte Zielgenanalysen identifizierten sechs Gene (PLAG1, PTEN, ACBD5, RAB11A, TP53INP2, RLF), die für drei der vier Kandidaten-miRNAs vorhergesagt wurden.

Diese Studie deutet auf eine Rolle von miR-21, miR-26a, miR-29a und miR-142-3p bei der T-Zellaktivierung während der TB-Erkrankung hin.

Abstract

Following an infection with the intracellular bacterium *Mycobacterium tuberculosis* the vast majority of infected individuals is protected from developing active tuberculosis (TB) disease. Just 5 - 10 % of infected individuals develop an active TB during their lifetime. CD4⁺ T cells play a central role for *M. tuberculosis*-specific immunity. Effective immune protection is mediated by IFN γ -secreting T helper type 1 cells. The reasons for immune protection failure remains elusive.

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNAs, which regulate gene expression by inhibiting translation or mRNA degradation. MiRNAs influence CD4⁺ T cell function and therefore may affect susceptibility to active TB.

In this study human CD4⁺ T cells of TB patients, latently *M. tuberculosis*-infected (LTBI), and non *M. tuberculosis*-infected individuals from Germany were analyzed for the expression of 29 preselected miRNAs. Four miRNAs, namely miR-21, miR-26a, miR-29a, and miR-142-3p were expressed at lower levels in TB patients compared to LTBI and non *M. tuberculosis*-infected individuals. Initial analyses did not reveal similar differences in a cohort from Ghana. The characterization of candidate miRNAs expression after *in vitro* stimulation showed decreased miR-29a expression after T cell receptor specific stimulation of naive T cells. Expression analyses in T cell clones revealed increased miR-29a and miR-142-3p expression in T helper type 17 clones whereas T helper type 1 clones showed decreased expression of miR-26a after *in vitro* stimulation. Notably the inhibition of miR-29a expression by antagomirs had no effect on cytokine expression of CD4⁺ T cells including the target of miR-29a IFN γ . These results are contrary to studies in mice where an inverse correlation between the expression of miR-29a and IFN γ was detected [1]. In order to identify targets of candidate miRNAs we performed sequence-based target-gene analysis and identified six genes (PLAG1, PTEN, ACBD5, RAB11A, TP53INP2, RLF), which were predicted for three of the four miRNA candidates.

This study suggests a role of miR-21, miR-26a, miR-29a, and miR-142-3p in T cell activation during TB. The exact role of candidate miRNAs will be characterized by concomitant modulation candidate miRNA expression in T cells.

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
bp	Basenpaar
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
Ca	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
Cy...	Cyanin dye...
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Bufferd Saline
EDTA	Ethylendiamintetraethansäure
eGFP	enhanced grün-fluoreszierendes Protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	Forward Angle Light Scatterer
HEK	Human Embryonal Kidney
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IL-...	Interleukin-...
IFN	Interferon
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
KCM	Kalium Calcium Magnesium
kDa	Kilodalton
LeGO	<i>Lentiviral Gene Ontology</i>
LTBI	latent <i>M. tuberculosis</i> -infizierte Person
M	Molmasse (g/mol)
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MDR	<i>Multi Drug-Resistent</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
miRNA	MicroRNA
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	messenger RNA

Abkürzungsverzeichnis Fortsetzung

<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
(q)PCR	<i>(quantitative) Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycocerythin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PPD	Purified Protein Derivative
R	Rezeptor
rpm	Revolution per Minute
RT	Raumtemperatur
SFFV	Spleen Focus-Forming Virus
SSC	Side Angle Light Scatterer
TB	Tuberkulose
TZR	T-Zell Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
WHO	World Health Organisation
XDR	<i>Extensively Drug-Resistant</i>

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleischer und Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus möchte ich für ihre Bereitschaft danken diese Arbeit als Gutachter/in zu lesen und zu bewerten.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Marc Jacobsen für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Betreuung, die Diskussionen und die immer positiven Einstellungen zu meinen Ergebnissen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Katja Kleinsteuber, Dr. Stefanie Schattling und Dr. Birte Kretschmer für eine unvergleichliche Atmosphäre, ihre unendliche Hilfsbereitschaft und die manchmal nötige emotionale Unterstützung. Dr. Julia Kolbaum möchte ich für die konstruktive Kritik an meiner Dissertation danken.

Bei der ganzen Abteilung für Immunologie bedanke ich mich für das tolle Arbeitsklima.

Meinen Eltern danke ich für Ihre bedingungslose Unterstützung und den grenzenlosen Glauben an Ihre Tochter.

Zum Schluss und im Besonderen möchte ich mich bei meiner Schwester Kira Heesch für die unermüdliche emotionale Unterstützung, den Trost, die Geduld und dass Sie immer an meiner Seite steht bedanken. Bei Torsten Wundenberg bedanke ich mich für seine ebenfalls unermüdliche Unterstützung.

1 Einleitung

1.1 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind einzelsträngige, nicht kodierende RNAs, welche durch nicht-perfekte Basenpaarung mit *messenger*RNA (mRNA) die Genexpression modulieren. Sie bestehen aus 18 - 24 Nukleotiden und werden aus endogenen Transkripten mit *hairpin*-Struktur generiert. Es wird angenommen, dass mehr als ein Drittel der humanen, proteinkodierenden Gene durch miRNAs reguliert werden. [2].

1.1.1 Biogenese von microRNAs

MiRNAs werden durch genomischen DNA-Sequenzen kodiert und als Teil eines Primärtranskripts (pri-miRNA), hauptsächlich durch die RNA-Polymerase II abgelesen [3, 4]. Ausnahmen bilden dabei miRNAs des Chromosom 19 miRNA Klusters (C19MC), welche durch die RNA-Polymerase III abgelesen werden [5]. Häufig sind miRNAs im Bereich der Introns von proteinkodierenden Genen lokalisiert und liegen oft in Clustern vor [6, 7], sie können aber auch als einzelne Gene kodiert sein [8]. Die pri-miRNA besitzt typischerweise neben einem 5' *Cap* einen 3' Poly-A-Schwanz [3] und bildet eine *stem-loop*-Struktur, welche die reife miRNA enthält. Im allgemein anerkannten MIRNA BIOGENESEWEG (Abbildung 1.1.1) werden diese Strukturen durch einen Multiproteinkomplex mit den zwei Kernkomponenten Drosha und *Di George Syndrome critical region gene 8* (DGCR8) erkannt [9, 10, 11]. Im *Mikroprozessor* bindet das doppelsträngige RNA-Bindeprotein DGCR8 an der Basis der *stem-loop*-Struktur und ermöglicht damit die Positionierung des RNase III Enzyms Drosha, welches das katalytische Zentrum des Komplexes enthält [12]. Drosha schneidet die doppelsträngige *stem-loop*-Struktur ca. 11 Basenpaare (bp) von der Basis des Stammes aus, was zur Freisetzung eines *hairpin*-geformten RNA Moleküls mit 70 - 100 bp Länge und einem 2 Nukleotidüberhang am 3'-Ende führt [10]. Die entstandene *precursor* miRNA (pre-miRNA) wird anschließend spezifisch durch den nuklearen Rezeptor Exportin 5 erkannt und Ran-GTP abhängig exportiert [13, 14, 15]. Im Zytosol wird die pre-miRNA durch das RNase III Enzym Dicer und das doppelsträngige RNA Bindeprotein *transactivating response RNA-binding protein* (TRBP) weiter prozessiert [16]. Dicer bindet den 3'-Überhang und spaltet mit seinen zwei katalytischen Domänen innerhalb des doppelsträngigen Stammes der Haarnadel-Struktur. Dabei entsteht eine doppelsträngige RNA mit einer Länge von 22 Nukleotiden und 3'-Überhängen an beiden Enden [17]. Der reife miRNA-Strang, wird

in ein Ago Protein überführt, während der zweite Strang (Stern (*)-Strang), degradiert wird. Der gebildete Komplex aus Dicer, Ago, miRNA und in Säugern TRBP wird als *miRNA induced silencing complex* (miRISC) bezeichnet [18, 19, 20]. In Abhängigkeit des Grades der Komplementarität zwischen miRNA und der Ziel-mRNA kommt es zur Repression (geringe Komplementarität) oder Degradierung (hohe Komplementarität) der mRNA [21, 22].

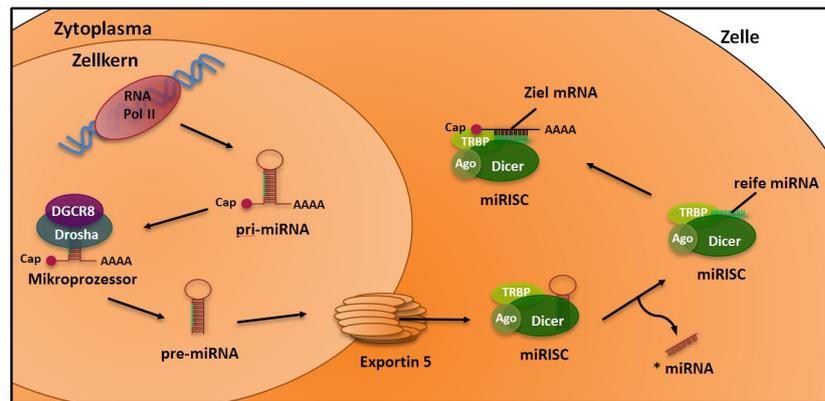


Abbildung 1.1.1: MicroRNA Biogenese. MiRNA Gene werden mit Hilfe der RNA Polymerase II zur pri-miRNA transkribiert. Diese tragen sowohl einen 3'Poly-A Schwanz, als auch eine 5'7-Methylguanolin Kappe (*Cap*). Durch den Mikroprozessor, bestehend aus Drosha und DGCR8, wird die pri-miRNA zu einer 70 - 100 bp langen pre-miRNA prozessiert und über den nuklearen Rezeptor Exportin 5 ins Zytoplasma transportiert. Dicer prozessiert die pre-miRNA zunächst in ein 18 - 24 bp langes miRNA-Duplex, welches nach Entwindung getrennt wird. Die einzelsträngige, reife miRNA wird in den miRISC (*miRNA induced silencing complex*) eingebaut und bindet anschließend an die Zieltranskripte. Die Inhibition der Zieltranskripte wird entweder über Repression oder Degradierung vermittelt. DGCR8 = *Di George Syndrome critical region gene 8*, TRBP = *transactivating response RNA-binding protein*, pre-miRNA = *precursor miRNA*, pri-miRNA = *primäre miRNA*, miRISC = *miRNA induced silencing complex*

1.1.2 Wirkmechanismus von miRNAs

Die derzeitige Literatur zeigt verschiedene Theorien und Hypothesen auf, wie miRNAs die Regulation von Genen vermitteln. Zum einen haben miRNAs möglicherweise spezifische Eigenschaften, welche zur Genregulation beitragen. Zum anderen resultiert die Wirkung von miRNAs aus einer Kombination und Interaktion der Expression von miRNAs und proteinkodierenden Genen. [23, 24]. Contreras et al. stellten dazu drei Konzepte auf [25]:

(i) MiRNAs scheinen in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Funktionen zu haben. Hervorgerufen wird dies durch die Anwesenheit unterschiedlicher Zielgene im Zuge differentieller Transkriptionsprogramme. Zum Beispiel scheint es für miR-146a unterschiedliche Zielgene in myeloiden Zellen und regulatorische T-Zellen zu geben. In myeloiden Zellen reguliert miR-146a *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF 6) und *interleukin-1 receptor-associated kinase 1*

(IRAK 1), während in regulatorischen T-Zellen *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT 1) als ein Zielgen von miR-146a nachgewiesen werden konnte [26, 27, 28].

(ii) MiRNAs regulieren die Genexpression durch unvollständige Hemmung ihrer Zielgene. Durch Experimente, in denen miRNAs überexprimiert oder inhibiert wurden, konnte gezeigt werden, dass miRNAs nicht unbedingt zum kompletten Funktionsverlust ihres Zielgens führen und somit als Feinregulatoren fungieren (siehe MiRNAs als Feinregulatoren). Allerdings können miRNAs auch stärkere Auswirkungen haben. So führt die zunehmende Repression von *c-Myb* durch miR-150 zu einem drastischen Anstieg der B-Lymphozyten [29]. *C-Myb* ist ein Transkriptionsfaktor, welcher eine Vielzahl von Schritten während der Lymphozytenentwicklung steuert [30].

(iii) MiRNAs regulieren zeitabhängige Prozesse im Immunsystem. Sie können möglicherweise schneller als Transkriptionsfaktoren agieren, da sie weder Translation noch Translokation in den Nukleus benötigen [23]. Weiterhin fungieren sie möglicherweise als "verzögerte Schalter" in negativen Rückkopplungsschleifen. Für miR-21 konnte gezeigt werden, dass diese zu einer verzögerten Inhibition von *programmed cell death 4* (PDCD 4) führt, nachdem PDCD 4 durch NF- κ B induziert wurde [31].

Die Regulation von Genen durch miRNAs erfolgt über zwei Mechanismen: Durch Spaltung der Ziel-mRNA oder durch translationale Repression. Die Spaltung der Ziel-mRNA erfolgt, wenn eine perfekte oder nahezu perfekte Komplementarität der miRNA zur Ziel-mRNA vorliegt. Nach Bindung der Ziel-mRNA an die miRNA im RISC-Komplex, fungiert dieser als eine Endonuklease, welche die Ziel-mRNA spaltet [32, 33]. Dieser Mechanismus tritt jedoch hauptsächlich in Pflanzen auf [34]. Bei Tieren ist die Komplementarität der miRNA zur Ziel-mRNA deutlich geringer. Sie beschränkt sich auf 5 - 6 Nukleotide (Nukleotid 2 - 7 oder 2 - 8) am 5'-Ende der miRNA [35, 36, 37] und wird als "*seed-Sequenz*" bezeichnet. Durch die geringe Komplementarität der miRNA zur Ziel-mRNA führt die Bindung an den RISC-Komplex zur Blockade der Translation und so zur Inhibition der Expression des Proteins [38]. Guo et al. konnten kürzlich jedoch auch bei Säugetieren eine Herunterregulation der Ziel-mRNA und damit den Abbau durch miRNAs nachweisen [39]. Aufgrund der geringen Anzahl von komplementären Nukleotiden, die zur Bindung an die Ziel-mRNA benötigt werden, wird vermutet, dass etwa ein Drittel der humanen proteinkodierenden Gene durch miRNAs reguliert werden [37, 36].

Wie beschrieben spielen miRNAs eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression von Genen. Veränderungen der Expression einzelner miRNAs können daher schwerwiegende Folgen haben. Für miR-155 beispielsweise führt der Funktionsverlust durch *knock-out* im Zusammenhang mit dem Immunsystem zu einer gestörten Entwicklung der T-Helferzellendifferenzierung und Funktionalität von B-Zellen, T-Zellen und dendritischen Zellen führt [40, 41]. Allerdings sprechen einige Forschungsergebnisse dafür, dass nicht alle miRNAs für einen Organismus es-

sentiell sind. So konnte in *C. elegans* gezeigt werden, dass die Mehrheit der miRNAs, nach systematischer Deletion von 83 % der bekannten miRNAs, für Viabilität und Entwicklung nicht benötigt wird [42]. Funktionelle Redundanz durch identische "seed-Sequenzen" und die Tatsache, dass der Funktionsverlust ganzer miRNA-Familien durch die Expression einer einzelnen miRNA aufgehoben werden kann, bieten mögliche Erklärungsansätze [43, 44]. MiRNAs haben eine Vielzahl von Zielgenen und sind dadurch an verschiedenen Proteinnetzwerken und Signalwegen beteiligt. Desweiteren induzieren miRNAs eine schnelle Regulation der Zielgenexpression. So führt in HeLa-Zellen die Überexpression einer einzelnen miRNA zur Herunterregulation von ca. 100 Transkripten innerhalb von 12 Std. [45]. Weiterhin wurde gezeigt, dass fast 50 % der miRNA Zielgene zwei oder mehr Bindungsstellen für verschiedene miRNAs aufweisen [46], und dass verschiedene miRNAs durch die gleichen Stimuli induziert werden können [47]. Somit bieten die verschiedenen Eigenschaften und Wirkmechanismen von miRNAs eine Erklärung dafür, dass einzelne miRNAs sowohl regulierend, als auch entscheidend auf die Expression ihrer Zielgene wirken können.

MiRNAs als Feinregulatoren

Das Potential von miRNAs, als Feinregulatoren von Prozessen zu fungieren, lässt sich gut am Beispiel des Immunsystems darstellen. Hier scheinen miRNAs nicht nur zur Funktionalität der Immunantwort [41, 40], sondern auch zur Homöostase beizutragen [48]. Nach der erfolgreichen Abwehr einer Infektion muss eine schnelle Rückkehr zu homöostatischen Bedingungen erfolgen, um Zerstörung gesunder, wirtseigener Zellen zu verhindern und die Reaktivität des Immunsystems gegenüber evtl. neuen Pathogenen zu gewährleisten. MiRNAs blockieren die Translation und sind geeignet eine solche Funktion (Rückkehr zu Homöostase) zu übernehmen. Hinweise hierfür liefern Autoimmunerkrankungen, bei denen eine Rückkehr zu homöostatischen Bedingungen nicht mehr gewährleistet ist und eine Beteiligung von miRNAs gezeigt werden konnte. Ein Beispiel ist die Systemische Lupus Erythematose (SLE). Hierbei handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der es zur Bildung autoreaktiver Antikörper gegen Proteine des Zellkerns kommt. Daraus resultieren unter anderem eine gesteigerte Apoptose von Monocyten, B- und T-Zellen. Für Patienten mit SLE wurde beschrieben, dass in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) miR-17-5p, miR-196a und miR-125a herunterreguliert sind [49, 50]. Möglicherweise ist durch die veränderte Expression der miRNAs die Rückkehr zur Homöostase des Immunsystems nicht mehr möglich. Weiterhin bieten miRNAs das Potential der Feinregulation der Genexpression in nahe verwandten Zelltypen. Konventionelle und regulatorische T-Zellen des Immunsystems unterscheiden sich nur in der Expression weniger Gene [51]. Somit muss die Anwesenheit bestimmter Proteine für Differenzierung und Funktion spezifischer Zellpopulationen genau reguliert werden. Zhou et al. haben im Mausmodell gezeigt, dass der *knock-out* von Dicer in regulatorischen T-Zellen zum Verlust der Linienstabilität führt. Hervorgerufen wurde dies durch die Herunterregulation des

für regulatorischen T-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktors *forkhead box p3* (Foxp3). Weiterhin exprimiert ein Teil der regulatorischen T-Zellen IL-4 und IFN γ . Die Hauptaufgabe von regulatorischen T-Zellen im Immunsystem besteht darin die Immunantwort zu inhibieren, um pathologische Folgen für den Organismus zu verhindern. Nach dem Verlust von Dicer verloren die regulatorischen T-Zellen ihre immunsuppressive Fähigkeit [52].

MiRNAs scheinen aber auch zur Aufrechterhaltung von homöostatischen Bedingungen im Zusammenhang mit metabolischen Vorgängen zu stehen. Beispielsweise konnte für die Leberspezifische miR-122 ein Einfluss auf im Blut zirkulierendes Cholesterin gezeigt werden [53]. Des Weiteren ist eine Vielzahl von Krebsarten mit einer veränderten Expression von miRNAs assoziiert (zusammengefasst in [54]).

Somit können miRNAs als Feinregulatoren der Genexpression fungieren und teilweise essentielle zelluläre Funktionen kontrollieren [17, 55, 56].

1.1.3 Krankheits-assoziierte miRNAs

Auf Basis der beschriebenen Funktionen von miRNAs im Zusammenhang mit der Physiologie des Immunsystems [57] ist die Entstehung von immun-vermittelten Krankheiten und Allergien durch eine abnorme Expression von miRNAs denkbar und teilweise bereits beschrieben.

Psoriasis ist eine chronische Hautentzündung, welche durch extreme Proliferation und gestörte Differenzierung von Keratinozyten gekennzeichnet ist [58]. Es konnte gezeigt werden, dass erkrankte Haut im Vergleich zu gesunder Haut eine Hochregulation von miR-203 aufweist. Dabei korrelierte die miR-203 Expression mit der Herunterregulation des *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3), welches an der Regulation der Entzündungsantwort und Keratinozytenfunktion beteiligt ist [59]. Ein weiteres Beispiel der möglichen Beteiligung von miRNAs an der Entwicklung von Psoriasis ist miR-146a [60], die bei Psoriasis überexprimiert wird. Für miR-146a sind *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6) und *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1* (IRAK1), beide involviert in die Regulation des TNF α -Signalweges, als Zielgene beschrieben [61].

In aktiven Multiple Sklerose Läsionen konnte eine Hochregulation von miR-155 nachgewiesen werden. MiR-155 hat als Zielmolekül CD47, ein Signalmolekül, welches die Phagozytose durch Makrophagen verhindert. Die Inhibierung der Expression von CD47 durch miR-155 resultiert in einer gesteigerten Phagozytose von Myelin [62].

Neben Autoimmunerkrankungen sind entzündliche Störungen, wie z.B. Arteriosklerose und Allergien im Organismus eine weitere schwere Fehlfunktion des Immunsystems. Bei der Arteriosklerose kommt es durch chronische Inflammation und die Einwanderung von Leukozyten in die Arterienwand zum Verlust der endothelialen Integrität [63]. Für miR-126 wurde gezeigt, dass diese die Expression des *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) inhibiert und somit die Adhärenz von Leukozyten an die Endothelzellen verhindert [64].

Infektionskrankheiten sind bezüglich der Beteiligung von miRNAs nur wenig untersucht.

Gerade bei Virusinfektionen gibt es jedoch Forschungsergebnisse, die eine Regulation der Infektion durch miRNAs vermuten lassen. Für das *human immune-deficiency virus 1* (HIV-1) konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust von Dicer oder Drosha zur Steigerung der HIV-Replikation in PBMCs von HIV-infizierten Spendern führt [65]. Für das Hepatitis C Virus (HCV) konnten Jopling et al. zeigen, dass die Inaktivierung von miR-122 die HCV Replikon RNA um ca. 80 % reduziert [66].

Auch für fakultativ intrazelluläre Bakterien konnte die Beteiligung von miRNAs an der Regulation der Immunantwort gezeigt werden. Die Infektion von Wirtszellen mit *Salmonella typhimurium* führt zur Herunterregulation von IL-6 und IL-10 durch miRNAs der let-7 Familie und sekretierte Effektorproteine von *Salmonella* induzieren die Expression von miR-155 [67]. Auch *Listeria monocytogenes* induziert eine veränderte miRNA Expression in Wirtszellen. Für miR-146a, miR-let7a1 und miR-155 wurde eine veränderte Expression in Abhängigkeit der Pathogenlokalisierung und der Anwesenheit von bakteriellen Effektorproteinen nachgewiesen [68].

Zusammenfassend scheinen miRNAs eine weitreichende Rolle im Immunsystems zu spielen. Sie tragen nicht nur zur Gewährleistung einer funktionierenden Immunantwort bei, sondern können auch die Pathologie von Krankheiten beeinflussen. Im Zusammenhang mit der Tuberkulose gibt es kaum Untersuchungen zur Funktion von miRNAs.

1.2 Tuberkulose

Bei der Tuberkulose (TB) handelt es sich um eine Infektionskrankheit, welche durch *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) verursacht wird. Circa 2 Milliarden Menschen (1/3 der Weltbevölkerung) sind weltweit infiziert und jährlich sterben etwa 1,5 Millionen Menschen an den Folgen einer TB-Infektion. Zusammen mit HIV und Malaria gehört Tuberkulose zu den weltweit häufigsten Infektionserkrankungen. Regionen mit einer starken Verbreitung von HIV weisen ein besonders hohes Vorkommen von TB-Fällen auf, da die Infektion mit HIV die Entstehung einer aktiven Tuberkulose begünstigt [69].

1.2.1 Übertragung und Infektionsverlauf

Die Übertragung von TB erfolgt durch Aerosole, welche *M. tuberculosis* enthalten und beim Husten oder Niesen ausgeworfen werden. Über die inhalierten Aerosole können die Bakterien in die Lunge und den Organismus gelangen. Weniger als 10 % der infizierten Menschen entwickeln im Laufe ihres Lebens überhaupt Symptome einer aktiven TB. Dabei ist die Gefahr an TB zu erkranken innerhalb der ersten zwei Jahre am höchsten, danach vermindert sich das Risiko beträchtlich. In 90 % der TB Infektionsfälle kommt es nicht zu einer akuten Symptomatik. Entweder wird der Erreger eliminiert, oder es kommt zu einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis*, bei welcher ein Gleichgewichtszustand zwischen dem Immunsystem des Wirtes und der

Ausbreitung des Pathogens entsteht. Kontrolliert durch das Immunsystem können die Erreger so ein Leben lang im Wirt persistieren. Dieser Zustand wird auch als *latently M. tuberculosis infected* (LTBI) bezeichnet. Die latente TB-Infektion kann jedoch durch die Störung der Wirtsimunität in eine aktive TB konvertieren. So tragen Faktoren wie HIV-Koinfektionen, anti-TNF α Therapie, Diabetes, Alkohol oder starke Unterernährung zum Ausbruch einer aktiven TB bei. Die Verhinderung der Entwicklung einer aktiven TB bei LTBI ist damit ein wichtiger Schritt, um die Übertragung und Ausbreitung von TB einzudämmen [70].

1.2.2 Epidemiologie

Klassischerweise wird Tuberkulose mit Armut, Überbevölkerung und Mangelernährung assoziiert. Die höchste TB-Inzidenz und Mortalität ist in Ländern mit geringem Einkommen zu finden. Nach HIV ist Tuberkulose weltweit die zweithäufigste Todesursache [69].

Insgesamt ist die Infektionsinzidenz seit 2002 gesunken, allerdings gab es 2008 ca. 440.000 Fälle von TB mit einer Multiresistenz gegen die zur Behandlung verwandten Antibiotika (MDR-TB) [69]. Die *World Health Organisation* (WHO) berichtete 2010 von 8,8 Mio. Neuinfektionen und 1,2 Mio. Todesfällen. In Abbildung 1.2.1 ist die von der WHO geschätzte TB-Inzidenz im Jahr 2010 dargestellt [69]. Mit 5,2 Mio. (59 %) Neuinfektionen in Asien und 2,3 Mio. (26 %) Neuinfektionen in Afrika liegen diese beiden Kontinente an der Spitze der Verbreitung von TB. Geringere Fallzahlen wurden in der Ostmediterranen Region (620.000 = 7 %), in Europa (440.000 = 5 %) und Amerika (270.000 = 3 %) geschätzt [69]. Tuberkulose stellt damit gerade in von Armut betroffenen Ländern ein erhebliches Infektionsproblem dar, dessen Gefährlichkeit durch das Auftreten von mehrfach und extrem Medikamenten-resistenten TB-Stämmen noch zugespitzt wird.

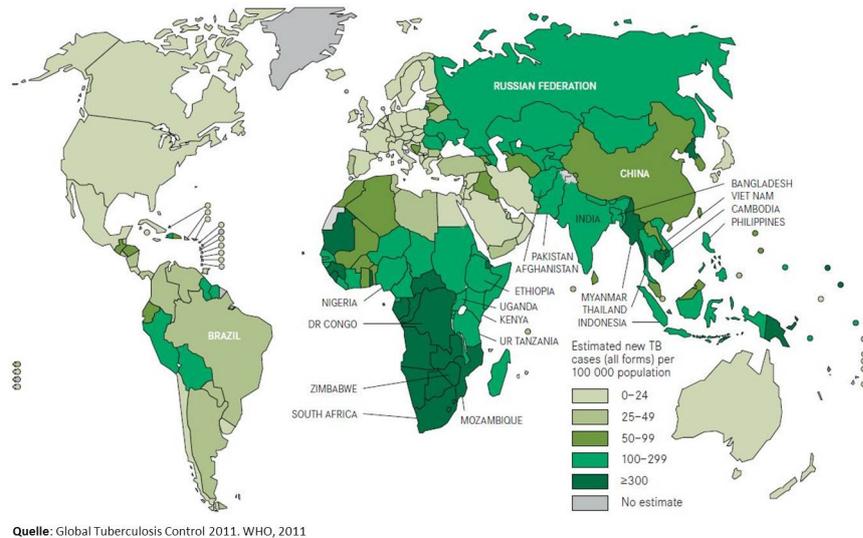


Abbildung 1.2.1: Geschätzte Tuberkulose Inzidenz im Jahr 2010. Aus der Intensität der Grünfärbung der Länder ist ersichtlich, dass die Tuberkulose im Jahr 2010 in Asien und Afrika am stärksten verbreitet war [69].

1.2.3 Diagnose

Für die traditionelle Diagnose einer aktiven TB werden verschiedene Methoden angewandt. Eine Röntgenaufnahme des Brustkorbes (Thorax) macht möglicherweise vorhandene Gewebeneubildungen, s.g. Granulome, sichtbar. Mikroskopisch kann *M. tuberculosis* mit Hilfe der Ziehl-Neelson-Färbung im Sputum der Lunge diagnostiziert werden [71]. Hierbei wird jedoch lediglich die Anwesenheit säurefester Bakterien bestimmt. Bei der Kultur von *M. tuberculosis* auf festen Medien werden antimikrobielle Substanzen dem Nährboden (wie enzymatisch verdautes Casein) in der Form zugefügt, dass nur Mykobakterien eine Replikation ermöglicht wird (z.B. 7-H11-Agar) [72]. Aufgrund der Beschaffenheit der Kolonie kann *M. tuberculosis* von anderen Mykobakterien unterschieden werden [73]. Allerdings Bedarf dieses langjähriger Erfahrung und die Dauer der Kultur kann bis zu 8 Wochen betragen. Dabei kann in 10 - 20 % der Fälle *M. tuberculosis* nicht erfolgreich kultiviert werden [74]. Heutzutage tragen immunologische Nachweisverfahren stark zur schnellen und genauen TB-Diagnose bei. Beim Tuberkulin Haut Test (TST; *tuberculin skin test*) wird ein gereinigtes Kulturfiltrat von *M. tuberculosis* (PPD; *purified protein derivative*) interdermal injiziert. Anschließend bildet sich bei einer *M. tuberculosis* Infektion an der Einstichstelle aufgrund einer verzögerten Hypersensitivitätsreaktion eine messbare Schwellung und Rötung [75]. Nachteil dieses Tests ist die geringe Spezifität, da auch mit dem TB-Impfstoff *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-geimpfte und mit atypischen Mykobakterien (z.B. *M. avium*) infizierte Personen positiv auf den Test reagieren [76]. Eine gesteigerte Spezifität bietet der QuantiFERON®TB Gold-Test. Dabei handelt es sich um einen so genannten *IFN γ release assay* (IGRA). Mit spezifischen Antigenen von *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10, TB7.7) werden dabei T-Zellen des peripheren Blutes *in vitro* stimuliert. Anschließend wird die

IFN γ Sekretion mittels eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantitativ bestimmt [77].

1.2.4 Therapie

Derzeit beinhaltet die erste Wahl der TB-Therapie einen Cocktail aus vier Medikamenten: Isoniazid (INH), Rifampicin (RIF), Pyrazinamid (PZA) und Ethambutol (EMB) oder Streptomycin (SM) [78]. Die Dauer der Chemotherapie beträgt sechs Monate, wobei in den ersten zwei Monaten (Initialphase) alle vier Medikamente eingenommen werden und in den folgenden vier Monaten (Kontinuitätsphase) die Behandlung mit INH und RIF beendet wird [79]. Kommt es im Rahmen dieser Therapie zum Auftreten von Unverträglichkeiten oder Resistenzen, so werden Medikamente zweiter Wahl eingesetzt. Diese haben meist eine höhere Toxizität, sowie eine geringere Effektivität. Es handelt sich dabei um Paraaminosalicylsäure (PAS), Kanamycin (KM), Fluorochinolone (FQ), Capreomycin, Ethionamid (ETH) und Cycloserin (CS). Die genannten Medikamente haben entweder bakteriostatische (EMB, PAS, CS, ETH), oder bakterizide (SM, INH, RIF, SM, FQ, KM) Eigenschaften [80].

Der Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelte attenuierte Lebendimpfstoff *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) bietet keinen vollständigen Schutz gegen eine Infektion mit Tuberkulose [81]. Nur bei Kindern vermittelt die Vakzine einen Schutz vor schweren Verlaufsformen der Tuberkulose, wie Miliartuberkulose (hirsekorngroße Bakterienherde in der Lunge und anderen Organen) oder Meningitis [82], bei Erwachsenen ist der Impfstoff nahezu wirkungslos.

1.2.5 Problematik der Verbreitung von Tuberkulose

Die frühzeitige Diagnose einer aktiven TB ist essentiell, um eine Übertragung und damit Verbreitung der Krankheit zu verhindern. Biomarker, d.h. Eigenschaften, die objektiv bestimmt werden und einen Indikator für normale Prozesse, pathologische Prozesse, oder pharmakologische Antworten auf therapeutisches Eingreifen darstellen, konnten bei der TB bisher nur bedingt identifiziert werden [83, 84, 85]. Verschiedene Moleküle werden als Biomarker für Behandlungserfolg, Impfschutz oder Status der Immunität diskutiert, jedoch fehlen bisher eindeutige Validierungen [83]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die IL-10 Expression während der Therapie von TB sinkt und dass das IFN γ /IL-10 Verhältnis mit dem Erfolg der Behandlung korreliert [86]. Als Gold-Standard zur Unterscheidung zwischen nicht-infizierten und *M. tuberculosis* infizierten Patienten dient bereits die Bestimmung der IFN γ Expression im QuantiFERON-Test. Allerdings ist mit diesem Test die Unterscheidung zwischen einer aktiven und einer latenten TB-Infektion nicht möglich. TB-Biomarker sollten es ermöglichen zwischen TB und LTBI zu differenzieren, den Verlauf der Therapie zu beurteilen, die Suszeptibilität einzuschätzen und zur Überwachung klinischer Studien neuer Impfstoffe und Antibiotika geeignet sein. Diese Ansätze sind Gegenstand der derzeitigen Forschung.

Eine weitere Problematik bei der Eindämmung der weltweiten Tuberkulose ist das Auftreten von Resistenzen von *M. tuberculosis* Stämmen. Man unterscheidet dabei die *multi drug-resistant TB* und die *extensively drug-resistant TB* (XDR-TB). Neben der Verbreitung von resistenten TB-Erregern ist schon die Therapie einer einfachen TB-Infektion problematisch. Die Therapiedauer von sechs Monaten erfordert von den Patienten eine hohe Zuverlässigkeit bei der regelmäßigen Einnahme der Medikamente (*Compliance*). Dieses Problem verschärft sich bei einer Infektion mit resistenten Erregern, da sich hier die Therapiedauer auf 22 Monate erhöht. Unregelmäßige Einnahme der Medikamente kann wiederum zur Entwicklung von Resistenzen führen.

1.3 Die Immunantwort bei der Tuberkulose

Das detaillierte Verständnis der durch *M. tuberculosis* im Menschen induzierten Immunantwort, sowie der bakteriellen Mechanismen, die zu einer Modulation dieser Immunität führen, sind wichtige Voraussetzungen für die Entwicklung potentieller Impfstoffe und die erfolgreiche Bekämpfung der Tuberkulose.

1.3.1 Alveolarmakrophagen

Um eine Infektion mit *M. tuberculosis* zu kontrollieren ist die Initiierung der angeborenen Immunantwort essentiell. *M. tuberculosis* gelangt bei einer Infektion über die Atemwege in die Lunge und trifft dort, als erstes Glied der Immunabwehr, auf so genannte Alveolarmakrophagen (AM). Diese phagozytieren *M. tuberculosis* und es kommt zur Bildung antimykobakterieller Effektormoleküle, wie reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffintermediate [87]. *M. tuberculosis* kann jedoch nicht komplett eliminiert werden, denn es verhindert die Phagolysosomenbildung in den AM [88] und mindert die Sensitivität der AM gegenüber $\text{IFN}\gamma$ [89]. Die Aktivierung der AM durch $\text{IFN}\gamma$ ist essentiell für die Kontrolle der Infektion. In $\text{IFN}\gamma$ *knock-out* Mäusen wurde gezeigt, dass die Infektion mit einer sublethalen Dosis *M. tuberculosis* nicht kontrolliert werden konnten [90]. Auch das Effektorzytokin $\text{TNF}\alpha$ ist wichtig für die Kontrolle der Infektion. Zusammen mit $\text{IFN}\gamma$ wirkt es verstärkend auf die Aktivierung der AM [91]. Weiterhin fungieren die AM als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ). Sie präsentieren *M. tuberculosis* spezifische Antigene über den *major histocompatibility complex-II* (MHC-II) an T-Zellen. Im Verlauf der Infektion rekrutierte T-Zellen, vor allem CD4^+ T-Zellen, werden zur Sekretion von Effektorproteinen aktiviert.

1.3.2 Granulombildung

Die Infektion mit *M. tuberculosis* ist gekennzeichnet durch die Ausbildung so genannter Granulome in der Lunge. Dabei handelt es sich um eine organisierte Ansammlung von Immunzellen, zur Eindämmung der *M. tuberculosis* Infektion. Ein Granulom besteht im Zentrum haupt-

sächlich aus infizierten und nekrotischen Makrophagen. Die Makrophagen können zu mehrkernigen Riesenzellen (Langerhans-Riesenzellen) verschmelzen [92] oder in lipidreiche "Schaumzellen" differenzieren. Umgeben wird der nekrotische Kern hauptsächlich von Zellen des adaptiven Immunsystems, wie B- und T-Lymphozyten. Aber auch dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, Neutrophile und Fibroblasten tragen zur Bildung der Granulomstruktur bei. Durch das Absterben der infizierten Makrophagen im Inneren des Granuloms entstehen verkäsende Bereiche [93]. Im Zuge der Bildung des Granuloms vermindert *M. tuberculosis* seine Replikationsrate bis hin zum Stillstand [94]. Auf diese Weise kann *M. tuberculosis* unter Beibehaltung seiner Virulenz in einer Art Ruhezustand (Dormanz) über Jahre persistieren. Die Infektion befindet sich dann in der Latenzphase.

1.3.3 Die Rolle der T-Zellantwort

In Folge der Ausbildung einer angeborenen Immunantwort durch *M. tuberculosis* kommt es zur Aktivierung einer adaptiven Immunantwort. Koordiniert wird die adaptive Immunantwort durch im Thymus gereifte Lymphozyten, sogenannte T-Zellen. T-Zellen sind Antigen-spezifisch und erkennen nur Peptid-Antigene, welche über MHC von Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert werden. Dabei wird hauptsächlich zwischen zwei Arten von T-Zellen unterschieden: CD4⁺ T-Helferzellen (T_H) und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen.

CD4⁺ T-Zellen sekretieren nach Antigen-Stimulation über MHC-II Zytokine. Andere Immunzellen, wie Makrophagen und *Bursa fabricii* (B)-Zellen werden aktiviert, aber auch T-Zellen werden zur Proliferation und Differenzierung angeregt. Nach Aktivierung der naiven CD4⁺ T-Zellen findet die Differenzierung zu funktionellen Effektor T-Zellen statt. Dieser Prozess wird auch als T-Zellpolarisierung bezeichnet. In Abhängigkeit des umgebenden Zytokinmilieus differenzieren naive T-Zellen zu T_H1, T_H2 oder T_H17 Effektorzellen. Verschiedene Pathogene induzieren dabei über die Zellen des angeborenen Immunsystems ein unterschiedliches Zytokinmilieu. Durch die Anwesenheit von IFN γ und IL-12 differenzieren naive T-Zellen zu T_H1 Zellen. T_H1 Zellen produzieren als Effektorzytokin hauptsächlich IFN γ . Dieses Zytokin aktiviert Makrophagen und ist daher wichtig für eine schützende Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien und Viren. IL-4, IL-5 und IL-13 sind die Effektorzytokine der T_H2 Zellen und entscheidend für die Aktivierung von Mastzellen, Eosinophilen und B-Zellen. T_H2 Zellen differenzieren in Gegenwart von IL-4 aus und sind verantwortlich für die Abwehr von extrazellulären Erregern [95]. Seit einiger Zeit ist auch die Population der T_H17 Zellen allgemein anerkannt. T_H17 Zellen zeichnen sich durch die Sekretion des Effektorzytokins IL-17 aus [96]. Unter Anwesenheit der Zytokine IL-6, TGF β und IL-23 differenzieren naive T-Zellen zu T_H17 Zellen [97]. Es wird angenommen, dass T_H17 Zellen an der Abwehr von extrazellulären Bakterien beteiligt sind [98], ihre genaue Aufgabe ist bisher jedoch nicht geklärt. Bei der T-Zellpolarisierung inhibiert die Differenzierung des einen T_H-Subtyps, die Differenzierung der anderen T_H-Subtypen. Auch regulatorische T-Zellen (T_{reg}) bilden eine Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen. T_{reg} kontrol-

lieren und beenden die Immunreaktion, indem sie Effektor-T-Zellen inhibieren. Eine Fehlfunktion von T_{regs} kann zu einer Schädigung von gesunden Wirtszellen führen.

$CD8^+$ T-Zellen erkennen über MHC-I präsentierte Peptid-Antigen und dienen der direkten Eliminierung von infizierten oder entarteten Zellen. Hierfür werden zytotoxische Substanzen wie Perforin, Granzym oder FasLigand sekretiert. Infolge dessen wird die Apoptose in den Zielzellen induziert (zusammengefasst in [99]).

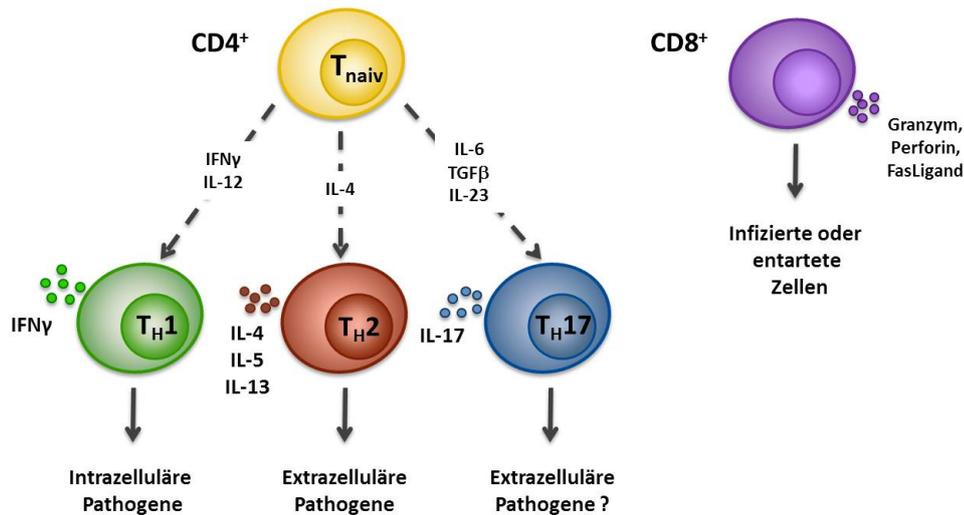


Abbildung 1.3.1: T-Zellpopulationen. Dringt ein Pathogen in einen Organismus ein so werden durch Zellen des angeborenen Immunsystems Zytokine sekretiert. In Abhängigkeit des Pathogens wird ein Zytokinmilieu induziert, welches zur Differenzierung verschiedener $CD4^+$ T-Helferzellpopulationen (T_H) führt. Naive $CD4^+$ T-Zellen differenzieren in Anwesenheit von $IFN\gamma$ und IL-2 zu T_H1 Zellen. T_H1 Zellen sezernieren $IFN\gamma$ und dienen der Abwehr von intrazellulären Pathogenen. In Anwesenheit von IL-4 differenzieren T_H2 Zellen aus den naiven $CD4^+$ T-Zellen. Diese Zellen sezernieren IL-4, IL-5 und IL-13 und dienen der Abwehr von extrazellulären Pathogenen. Wird von den Zellen des angeborenen Immunsystems IL-6, TGF β und IL-23 sekretiert, so differenzieren T_H17 Zellen aus den naiven $CD4^+$ Vorläufern. Durch die Sekretion des Effektorzytokins IL-17 werden vermutlich ebenfalls extrazelluläre Pathogene bekämpft. $CD8^+$ T-Zellen sezernieren Granzym, Perforin oder FasLigand und induzieren Apoptose in infizierten oder entarteten Zellen des Wirtes. (modifiziert aus Quelle: [100]).

$CD4^+$ T-Zellen bei der Tuberkulose

Dass speziell $CD4^+$ T-Zellen bei der Infektion mit *M. tuberculosis* eine essentielle Rolle spielen, konnte sowohl in humanen Studien, als auch im Mausmodell gezeigt werden. HIV-Patienten weisen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer TB-Infektion auf. Zurückzuführen war dies auf den sukzessiven Verlust der $CD4^+$ T-Zellen während einer HIV-Infektion [101]. Weiterhin führte die Depletion von $CD4^+$ T-Zellen in Mäusen zu einer gesteigerten *M. tuberculosis* Belastung in der Lunge [102]. $CD4^+$ T-Zellen differenzieren durch *M. tuberculosis* induziertes IL-12 zu T_H1 Zellen und sezernieren $IFN\gamma$. In humanen Studien konnte gezeigt werden, dass $IFN\gamma$ essentiell ist, um bei einer TB-Infektion die antimykobakteriellen Effektormechanismen der AM zu

induzieren [103, 87]. Weiterhin inhibiert $\text{IFN}\gamma$ die Differenzierung von $\text{T}_\text{H}2$ Zellen und fördert die Aktivierung weitere $\text{T}_\text{H}1$ Zellen [104, 105]. Das ebenfalls von $\text{T}_\text{H}1$ Zellen sekretierte $\text{TNF}\alpha$ ist an der Makrophagenaktivierung, sowie der Bildung und Aufrechterhaltung der Struktur des Granuloms beteiligt [106]. Dabei wirkt es kostimulatorisch zusammen mit $\text{IFN}\gamma$ [107]. Die Bedeutung von $\text{TNF}\alpha$ bei der Kontrolle einer Infektion mit *M. tuberculosis* konnte an Patienten mit Rheumatoider Arthritis gezeigt werden. Unter anti- $\text{TNF}\alpha$ Therapie besteht dabei ein gesteigertes Risiko der Reaktivierung einer Tuberkulose [108]. Neben $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ sekretieren $\text{T}_\text{H}1$ Zellen IL-2, welches zur klonalen Expansion von $\text{CD}4^+$ T-Zellen und zur Differenzierung von $\text{CD}8^+$ T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen beiträgt [109, 110]. $\text{T}_\text{H}2$ Zellen sekretieren IL-4 und inhibieren damit die Differenzierung von $\text{T}_\text{H}1$ Zellen. Typischerweise wird durch die Infektion mit Helminthen eine $\text{T}_\text{H}2$ Immunantwort induziert [111]. Koinfektionsstudien von Erwachsenen mit intestinalen Helminthen und *M. tuberculosis* zeigen einen negativen Effekt sowohl auf die *M. tuberculosis*-spezifische Immunität, als auch auf die TB-Therapie [112, 113]. Dabei konnte eine verminderte Expression von $\text{IFN}\gamma$ ($\text{T}_\text{H}1$ Zytokin) und eine gesteigerte Expression von IL-10 (T_reg Zytokin) nachgewiesen werden [114]. Auch für $\text{T}_\text{H}17$ Zellen wird eine Rolle bei der TB-Infektion vermutet. Scriba et al. zeigten, dass im Kindesalter mit BCG geimpfte Erwachsene nach Stimulation mit PPD eine starke $\text{T}_\text{H}17$ Immunantwort entwickeln. Da diese Zellen hauptsächlich vom Zentralen Gedächtnis Typ sind, bieten Mykobakterien-spezifische $\text{T}_\text{H}17$ Zellen möglicherweise einen lang-anhaltenden Immunschutz [115]. Auch wurde gezeigt, dass TB-Patienten im Vergleich zu LTBI und gesunden Kontrollen eine geringere Frequenz von $\text{T}_\text{H}17$ Zellen aufweisen [116]. T_reg haben die Aufgabe nach erfolgreicher Eliminierung eines Pathogens die entstandene Immunantwort abzustellen und zur Herstellung der homöostatischen Bedingungen beizutragen. Für die Beteiligung von T_reg an der Infektion mit *M. tuberculosis* gibt es kontroverse Ergebnisse. Zum Einen konnte in einem Makakken-Modell gezeigt werden, dass T_reg nötig sind damit die *M. tuberculosis* induzierte $\text{T}_\text{H}1$ Antwort nicht ausartet [117]. Zum Anderen scheinen T_reg an der verzögerten T-Zellantwort nach einer *M. tuberculosis* Infektion beteiligt zu sein. Sowohl in Maus und Mensch konnte eine gesteigerte Akkumulation und Proliferation von T_reg am Infektionsort detektiert werden [118, 119].

$\text{CD}8^+$ T-Zellen bei der Tuberkulose

Auch für $\text{CD}8^+$ T-Zellen wurde eine Beteiligung an der Immunabwehr gegen *M. tuberculosis* gezeigt. Mäuse mit einem defekten MHC-I Molekül zeigen eine erhöhte Sterblichkeit nach Infektion mit *M. tuberculosis* [120]. Obwohl Mykobakterien phagozytiert und damit normalerweise über MHC-II präsentiert werden, scheinen Translokation ins Zytosol [121, 122] und Apoptoseinduktion [123] die Aktivierung von $\text{CD}8^+$ T-Zellen zu ermöglichen. Neben der Sekretion von $\text{IFN}\gamma$, besteht die vorherrschende Aufgabe von $\text{CD}8^+$ T-Zellen jedoch wahrscheinlich in der Sezernierung zytotoxischer Substanzen (z.B. Perforin, Granzym, Granlysin FasLigand) zur Lyse infizierte AM [124].

1.4 MicroRNAs bei der T-Zellantwort

T-Zellen sind bei einer Infektion mit *M. tuberculosis* von großer Relevanz. Daher ist die Regulation der T-Zellantwort durch miRNAs von besonderem Interesse. Analysen des Expressionsprofils von T-Zellen zeigen ein breites Spektrum exprimierter miRNAs, sowie variierende Expressionsprofile in Abhängigkeit der Entwicklungsstadien von T-Zellen, sowie zwischen T-Zellsubpopulationen [125, 126, 127]. Cobb und Muljo et al. zeigten, dass ein globaler Funktionsverlust von *Dicer* (Enzym der miRNA Prozessierung siehe Abbildung 1.1.1) in T-Zellen zu einem Stillstand der T-Zellentwicklung und einer entarteten Entwicklung von T_H-Subpopulationen führt [128, 129]. Im Rahmen der T-Zellentwicklung konnte für miR-181a gezeigt werden, dass eine Herunterregulation zur Reaktivität von T-Zellen gegenüber körpereigene Antigenen führt [130]. Die Differenzierung von T_H-Zellen wird von miR-155 beeinflusst, da miR-155 defiziente Mäuse eine Polarisierung in Richtung T_H2 zeigen [41, 40]. Im Mausmodell induzierte die Infektion mit *M. tuberculosis* die Expression von miR-155 in Makrophagen [131]. Die AM interagieren stark mit T-Zellen. Sie präsentieren *M. tuberculosis* Antigene und produzieren das T_H1-Zytokin IFN γ . MiR-21 reguliert die Expression der IL-12p35 Zytokinuntereinheit [132], was eine T_H2 Polarisierung induziert. Auch MiR-126 führt zur Induktion einer T_H2 T-Zellantwort [133], was aufgrund der Inhibition der T_H1 Immunantwort negativen Einfluss auf die Bekämpfung der TB haben könnte. *Dicer*- oder *Drosha*-defizienten Mäuse zeigten eine beeinträchtigte Entwicklung oder Funktion von T_{reg}, was in einer letalen Autoimmunerkrankung resultiert [134, 135, 136]. Der T_{reg} Transkriptionsfaktor Foxp3 scheint die Expression von miR-142-3p zu inhibieren [137]. Lu et al. zeigten zusätzlich, dass ein durch *knock-out* von Foxp3 generiertes hyperreaktives Immunsystem nicht durch miR-146a defiziente T_{reg} gestoppt werden kann [27].

Die Ergebnisse einiger Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass *M. tuberculosis* die T-Zellantwort durch die Inhibition der Apoptose infizierter Zellen verzögert [138, 139, 140]. Für einige miRNAs wurde ebenfalls eine Beteiligung an der Regulation von apoptotischen Vorgängen gezeigt. Die Expression von miR-15a korreliert invers mit der Expression von *B cell lymphoma 2* (Bcl2). In einer leukämischen Zelllinie induziert die Repression von Bcl2 durch miR-15a Apoptose [141]. Ruan et al. zeigten, dass miR-23a die TNF α -induzierte Apoptose von Endothelzellen induziert [142]. Auch für miR-25 konnte eine Funktionalität im Zusammenhang mit Apoptose nachgewiesen werden. So führt die Herunterregulation von miR-25 in Eierstockkrebszellen zu einer gesteigerten Expression des pro-apoptotischen Proteins BIM, wobei dieses als direktes Zielgen von miR-25 nachgewiesen werden konnte [143]. In HEK293T Zellen (embryonale Nierenzellen) wurde nach Überexpression von miR-27a die Induktion von Caspase-abhängiger und -unabhängiger Apoptose gezeigt. *Fas Associated protein with Death Domain* (FADD), ein Apoptose-assoziiertes Gen, wurde dabei hoch reguliert [144].

Zielsetzung

Bei einer Infektion mit dem Pathogen *M. tuberculosis* kommt es in nur 10 % der Fälle zum Ausbruch einer aktiven Tuberkulose. 90 % der infizierten Personen verbleiben latent infiziert ohne klinische Symptome zu zeigen. Bei diesen LTBI ist das Immunsystem fähig die Ausbreitung der Infektion zu verhindern. Die genauen Ursachen die zur Entstehung einer aktiven TB oder einer latenten Infektion führen, sind nicht im Detail geklärt. Um die Verbreitung der Tuberkulose zu kontrollieren und bessere Behandlungsmethoden zu erzielen sind sogenannte Biomarker nötig. Diese sollten es erlauben nicht nur zwischen TB und LTBI zu unterscheiden, sondern auch den Erfolg der Therapie, sowie die Effektivität von Impfstoffen und neuen Medikamenten zu analysieren.

Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung immunologischer Prozesse, welche die Suszeptibilität gegenüber *M. tuberculosis* beim Menschen beeinflussen. Speziell die Rolle von microRNAs bei der Regulation der T-Zellantwort sollte näher definiert werden. Im ersten Schritt sollten dazu miRNAs identifiziert werden, welche zwischen aktiv TB-Erkrankten, LTBI und nicht-infizierten Personen differentiell exprimiert werden. Anschließend sollten die identifizierten miRNA-Kandidaten bezüglich ihrer Expression in den Reifungsphasen der T-Zellen, der T-Zellaktivierung, sowie der Polarisierung der T-Zellantwort charakterisiert werden. Im dritten Schritt sollten durch Modulation der miRNA-Kandidaten beschriebene Zielgene verifiziert und neue Zielgene identifiziert werden. Zuletzt sollte in Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern in Ghana die Relevanz der miRNA-Kandidaten unter Anderem bei der Behandlung der TB untersucht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/ Reagenz	Hersteller
Trypanblau (0,4 %)	GIBCO BRL (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (10.000 Einheiten/mL, 10 mg/mL)	PAA (Pasching, Deutschland)
Gentamycin (10 mg/mL)	PAA (Pasching, Deutschland)
Fötales Kälberserum	PAA (Pasching, Deutschland)
DPBS	PAN (Aidenbach, Deutschland)
BIOCOLL (r= 1,077 g/mL)	BIOCHROM AG (Berlin, Deutschland)
Brefeldin A	SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen, Deutschland)
Cytofix/Cytoperm [®]	BD BIOSCIENCES (Heidelberg, Deutschland)
Perm/Wash [®]	BD BIOSCIENCES (Heidelberg, Deutschland)
X-VIVO 15	LONZA (Köln, Deutschland)
Fixation Buffer	BioLegend (DS Uithoorn, Niederlande)
Permeabilisation Buffer	BioLegend (DS Uithoorn, Niederlande)
Ethanol	ROTH (Karlsruhe, Deutschland)
DMSO	SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen, Deutschland)
DMEM mit GLUTAMAX	GIBCO BRL (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	PAA (Pasching, Deutschland)
HBSS	GIBCO BRL (Karlsruhe, Deutschland)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kalciumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ampicillin (hitzesensitiv)	ROTH (Karlsruhe, Deutschland)
LB-Medium Pulver	SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen, Deutschland)
LB-Agar	SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen, Deutschland)
BSA	Serva (Heidelberg, Deutschland)
2x HBS	SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen, Deutschland)

Fortsetzung Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/ Reagenz	Hersteller
Chloroquin	GIBCO BRL (Karlsruhe, Deutschland)
Humanserum (AB)	PAA (Pasching, Deutschland)
Polybren	SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen, Deutschland)
Retronektin (1 mg/mL)	TaKaRa (Shiga, Japan)
Dithiothreitol (DTT)	GIBCO BRL (Karlsruhe, Deutschland)

2.2 Spenderzellen

Humane, mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden aus Vollblut oder BUFFY COAT isoliert, welche von freiwilligen Spendern des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE) und dem *Kumasi Centre for Collaborative Research* (KCCR) zur Verfügung gestellt wurden.

Die Studie erfolgte mit Zustimmung der Ethikkommission (Ärztchammer Hamburg, WF-07/09)

2.3 Stimulantien

Stimulus	Endkonzentration	Stockkonzentration	Hersteller
PMA	10 ng/mL	1 mg/mL (in DMSO)	SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen, Deutschland)
Ionomycin	1 µg/mL	1 mg/mL (in DMSO)	SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen, Deutschland)
<i>Dynabeads</i> [®] anti-CD3/28 human T-Cell-Expander	0,1 - 1 µL/ <i>well</i>	4 x 10 ⁷ <i>beads</i> /mL	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
rIL-2	20 U/mL	15000 U/mL	C. Steeg, BNI (Hamburg, Deutschland)
Brefeldin A	5 µg/mL	1 mg/mL (in EtOH)	SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen, Deutschland)

2.4 Monoklonale Antikörper

Alle verwandten Antikörper waren gegen humane Proteine gerichtet und stammen, falls nicht anders angegeben, aus der Maus.

Antikörper	Klon	Fluoreszenz- markierung	Hersteller
anti-CD3	SK-7	PerCP	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-CD3	RPA-T4	APC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-CD4	RPA-T4	APC-H7	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-CD4	SK-3	APC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-CD4	L200	PerCP	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-CD8	SK-1	FITC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-CD161	191B8	FITC	Miltenyi Biotech (B. Gladbach, Deutschland)
anti-CD45RO	UCHL1	PECy7	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-CD45RA	HI100	FITC	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-CD40L	24-31	APC-eFluor780	eBiosciences (San Diego, USA)
anti-TNF α	Mab11	AlexaFluor700	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-IFN γ	B-27	PE-Cy7	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-IL-17	N49-653	V450	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-IL-4	MPA-25D2	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
anti-CCR7 _{Ratte}	3D12	PE-Cy7	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

2.5 Medien und Puffer

Alle verwandten Medien und Puffer wurden mit doppelt destilliertem oder deionisiertem Wasser angesetzt. Zur Sterilisierung wurden hitzeempfindliche Lösungen über einen Filter mit 0,22 μ m Porengröße filtriert. Hitzeunempfindliche Lösungen wurden für 20 Min. bei 135 °C und 2 bar autoklaviert.

Fötales Kälberserum wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren 30 Min. bei 56 °C erhitzt, steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

2.5.1 Zellkulturmedien

T-Zellmedium

1 % Penicillin/Streptomycin
ad X-VIVO 15

Einfriermedium

20 % DMSO

ad Fötale Kälberserum

HEK-Medium

10 % Fötale Kälberserum

25 mM HEPES

1 % Penicillin/Streptomycin

ad DMEM + GlutaMAX™ + 4,5 g/L Glucose + Pyruvat

Jurkat-Medium (J-Medium)

10 % Fötale Kälberserum

10 mM HEPES

1 % Penicillin/Streptomycin

ad RPMI 1640 + L-Glutamin

2.5.2 Medien für die Kultur von *Escherichia coli***LB-Medium mit Ampicillin**

2 % LB-Medium Pulver

100 µg/mL Ampicillin

ad H₂O

LB-Agar mit Ampicillin

3,5 % LB-Agar

100 µg/mL Ampicillin

ad H₂O

2.5.3 Sonstige Lösungen**10 x MACS-Puffer**

5 % BSA

20 mM EDTA (pH = 8)

ad DPBS

1 x PermWash Puffer

10 % 10 x PermWash Puffer

ad H₂O

Blocklösung (Retronektinbeschichtung)

2 % BSA

ad DPBS

Waschlösung (Retronektinbeschichtung)

25 mM HEPES

ad HBSS

5 x KCM

0,5 M KCl

0,15 M CaCl₂

0,25 MgCl₂

ad H₂O

2.6 Enzyme

Enzym	Hersteller
BamHI <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
EcoRI <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
XhoI <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
XbaI <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
BglIII <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
HindIII <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
NotI <i>FastDigest</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

2.7 Oligonukleotide

Alle verwandten Oligonukleotide wurden von SIGMA-ALDRICH (Deisenhofen, Deutschland) bezogen

Primer	Sequenz (5' → 3')
miR-29a_fw	GCGCGGATCCACAGGATATCGCATTGTTGGAA
miR-29a_rv	GCGCGAATTCCATGCAATTCAGGTCAGTGAAA
miR-29a_XhoI_fw	GCGCCTCGAGACAGGATATCGCATTGTTGGA
miR-29a_NotI_rv	GCGCGCGGCCGCCATGCAATTCAGGTCAGTGAAA
miR-29a_BamHI_fw	GCGCGGATCCACAGGATATCGCATTGTTGGA
miR-29a_EcoRI_rv	GCGCGAATTCCATGCAATTCAGGTCAGTGAAA
miR-29a_100 bp flank_BglII_fw	GCGCAGATCTTAGCACTTAATAGATAGTACAG
miR-29a_100 bp flank_HindIII_rv	GCGCAAGCTTAAGAAAAATCACCTTTGCATTA
pri/pre miR-29a_fw 21	GCGCTTTTCTAGCACCATCTGAA
pri/pre miR-29a_rv 22	GCGCTCAGCATCATGGTGCTCTT

Die für den Nachweis der miRNA-Expression verwandten Primer wurden alle von APPLIED BIOSYSTEMS (Darmstadt, Deutschland) erworben. Die genaue Sequenz dieser Primer ist nicht bekannt.

2.8 Plasmide

Plasmid	Hersteller
LeGO-G	B.Fehse, UKE (Hamburg, Deutschland)
LeGO-iG2	B.Fehse, UKE (Hamburg, Deutschland)
LeGO-G2	B.Fehse, UKE (Hamburg, Deutschland)
pMDLg/pRRE	Addgene (Cambridge, USA)
pRSV-Rev	Addgene (Cambridge, USA)
phCMV-GALV-C _{4070A}	C. Stocking, HPI (Hamburg, Deutschland)

2.9 Kits

Bezeichnung	Hersteller
BD IMag™ anti-Human CD4 magnetische Partikel	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
NucleoSpin Extract II	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)
NucleoSpin Plasmid	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)
Plasmid Plus Maxi Kit (Vakuum)	Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.10 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
BD FACS LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
BD FACS Aria III Zellsortierer	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Corbett Real-Time PCR	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Nano Drop 2000c	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
γ-Bestrahlungsanlage (¹³⁷ Cs)	Steuerungstechnik & Strahlenschutz GmbH
BD IMag™ Magnet	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
MidiMACS Magnet	Miltenyi Biotech (B. Gladbach, Deutschland)
QIAvac 24 Plus Vakuumsystem	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAvac Verbindungssystem mit Abfallbehälter	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Laboport „N 811 KN.18“ (Vakuumpumpe für QIAvac)	KNF (Freiburg, Deutschland)
„Mr. Frosty“ Kryo-Einfriergefäß	Nalgene (Rochester, USA)
Sterilbank UVF 6.18 S	BDK (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)
Sterilbank <i>LaminAir HB2448</i>	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge <i>Centrifuge 5810R</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge <i>Megafuge 1.0</i>	Heraeus (Hanau, Deutschland)

2.11 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
96well Zellkulturplatte (CELLSTAR)	Greiner Bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
24-well Zellkulturplatte #351147	BD Falcon (Heidelberg, Deutschland)
24well Gewebekulturplatte	Greiner Bio-one
Flachbodenplatten mit Deckel	(Frickenhausen, Deutschland)
Einwegpipetten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
(5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Filter <i>CellTrics</i>	PARTEC (Görlitz, Deutschland)
Kryokonservierungsröhrchen	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Sterilfilter (0,22 µm)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Sterilfilter Millex [®] -GV PVDF (<i>low protein binding</i>)	Millipore (Billerica, USA)
Trypanblau 0,4 %	GIBCO BRL (Karlsruhe, Deutschland)
Zellkulturschalen für HEK-Zellen 10 cm #83.1802	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturschalen für Bakterien, 10 cm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
1 kB und 100 bp DNA-Marker	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Biocoll	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)

2.12 Software

Software	Hersteller
FCS Express V3	DeNovo Software (Los Angeles, USA)
BD FACSDiva 6.0	BD (Heidelberg, Deutschland)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc. (San Diego, USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Seattle, USA)

3 Methoden

Zur Erhaltung der Viabilität der Zellen und zum Schutz vor Kontamination wurden sämtliche Schritte, falls nicht anders angegeben, steril und bei 4 °C durchgeführt. Alle verwandten Lösungen wurden steril filtriert und sofern nicht anders angegeben auf 4 °C temperiert.

3.1 Probanden und Studie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Probenmaterial von verschiedenen Spendern verwandt.

Es wurden *buffy coats* aus Blutspenden von freiwilligen Spendern des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (UKE) (Hamburg, Deutschland) verwandt. Hierbei handelte es sich um gesunde Spender. TB-Patienten und LTBI wurden am UKE und am Asklepios Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie (München-Gauting, Deutschland) rekrutiert. Den Patienten wurden 20 mL venöses Blut für die Analysen entnommen.

	Probandenanzahl	Durchschnittsalter	Geschlecht (m/w)
TB	6	38 Jahre	4/2
LTBI	7	37 Jahre	3/4
gesunde Kontrollen	3	40 Jahre	1/2

Weitere TB-Patienten und Kontaktpersonen wurden durch eine Kollaboration mit Dr. E. Owuso-Dabo am *Kumasi Centre for Collaborative Research* (KCCR) (Accra, Ghana) rekrutiert. Den TB-Patienten wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten 20 mL venöses Blut entnommen. Den Kontaktpersonen wurde nur zu Zeitpunkt 1 Blut entnommen.

		Probanden- anzahl	Durchschnitts- alter	Geschlecht (m/w)
TB: Zeitpunkt 1	vor Beginn der TB-Therapie	13	35 Jahre	8/5
TB: Zeitpunkt 2	drei Monate nach Beginn der TB-Therapie (während der TB-Therapie)	11	34 Jahre	8/3
TB: Zeitpunkt 3	sechs Monate nach Beginn der TB-Therapie (nach Abschluss der TB-Therapie)	5	34 Jahre	4/1
Kontaktpersonen		11	38 Jahre	2/9

3.2 Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder *buffy coat*

In allen durchgeführten Experimenten wurde Vollblut oder *buffy coat* als Ausgangsmaterial verwendet. Mit Hilfe der Ficoll®-Dichtegradientenzentrifugation (Biocoll, Biochrom AG) wurden aus dem Ausgangsmaterial PBMCs isoliert. Monozyten und Lymphozyten konzentrieren sich dabei aufgrund ihres spezifischen Gewichts in einer intermediären Phase an.

Vollblut oder *buffy coat* wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. 15 mL Ficoll® wurden mit maximal 35 mL Blut/PBS-Lösung überschichtet. Zur Trennung der Zellpopulationen wurde 30 Min. bei 1500 rpm, Raumtemperatur (RT) und ohne Bremse zentrifugiert. Dabei entstehen vier Phasen: eine obere, gelbliche Plasmaphase, eine gräuliche Leukozytenphase, gefolgt von einer klaren Ficoll®-Phase und einer roten Erythrozytenphase. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt: Das Plasma wurde bis 2 cm oberhalb der Lymphozytenphase entfernt und anschließend die Leukozytenphase entnommen. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem PBS verdünnt und 20 Min. bei 1200 rpm und 4 °C mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Thrombozyten zusammen mit dem restlichen Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 1 mL PBS resuspendiert, mit 10 mL PBS verdünnt und 12 Min. bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Thrombozyten erneut zusammen mit dem restlichen Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 1 mL Medium oder PBS aufgenommen.

3.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Färbung toter Zellen wurde die Zellsuspension mit 0,04 % Trypanblau verdünnt. 10 µL der Suspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer (0,1 × 0,0025 mm²) überführt und die Zellzahl nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Anzahl der Zellen in einem Großquadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellen/mL}$$

3.4 Kryokonservierung von PBMCs

Zur Lagerung von Zellen über einen Zeitraum von mehr als einem Tag wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Dazu wurden die PBMCs in 0,5 mL FKS gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Kryokonservierungsröhrchen überführt und zügig tropfenweise 0,5 mL Einfriermedium (FKS/20 % DMSO) zugegeben. Mit Hilfe des Kryo-Einfrierbehälters "Mr. Frostys" (Nalgene), der für eine konstante Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C/Min. sorgt, wurden die Zellen zunächst auf -80 °C abgekühlt und anschließend für die Endlagerung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurde die gefrorene Zellsuspension angetaut und 1 mL 10 % FKS/PBS zugefügt. Die entstandene Zellsuspension wurde zügig in 9 mL 10 % FKS/PBS überführt und 10 Min. bei 1200 rpm und 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde einmal mit 1 mL kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation für 5 Min. bei 1500 rpm und 4 °C) und die Zellzahl bestimmt (s. 3.3).

3.5 Extrazelluläre Färbung von T-Zellen für die Durchflusszytometrie

Sämtliche Schritte der extrazellulären Färbung wurden in 96-well Platten und unter unsterilen Bedingungen durchgeführt. Überschritt die Zellsuspension ein Volumen von 50 µL, so wurden die Zellen sedimentiert (Zentrifugation für 5 Min., bei 1500 rpm und 4°C). Der Überstand wurde abgeworfen und die gewünschten Antikörper im Residualvolumen zugefügt. Die Zellen wurden resuspendiert und für 20 Min. bei RT und im Dunkeln inkubiert. Es wurde zweimal mit 180 µL FKS/PBS gewaschen (Zentrifugation für 5 Min., bei 1500 rpm und 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50 µL PBS zur durchflusszytometrischen Analyse resuspendiert.

3.6 Intrazelluläre Färbung von T-Zellen für die Durchflusszytometrie

Sämtliche Schritte der intrazellulären Färbung wurden auf Eis in 96-well Platten unter unsterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden für 10 Min. auf Eis gelagert und anschließend für 5 Min., bei 1500 rpm und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 100 µL *Cytofix/Cytoperm*[®] Lösung, zur gleichzeitigen Permeabilisierung und Fixierung, resuspendiert und für 25 Min. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 5 Min., bei 1700 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgeworfen und zur fortführenden Permeabilisierung zweimal mit 180 µL *Perm/Wash* Puffer gewaschen (Zentrifugation für 5 Min., bei 1700 rpm und 4 °C). Die Antikörper wurden ins Residualvolumen zu den Zellen gegeben, resuspendiert und für 30 Min., dunkel und bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal mit 180 µL *Perm/Wash* Puffer gewaschen. Für die durchflusszytometrische Analyse

wurden die Zellen in 50 μL PBS resuspendiert.

3.7 Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS)

Für die Anreicherung von CD4^+ und naiven T-Zellen wurden zwei verschiedene Systeme verwendet.

CD4^+ T-Zellen wurden mit dem Imag-System von BD Biosciences angereichert. Dazu wurden PBMCs für 5 Min. bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 mL MACS-Puffer resuspendiert. Nach erneutem Sedimentieren der Zellen wurden diese im Residualvolumen mit je 12,5 μL anti- CD4 magnetischen Partikeln pro 1×10^7 PBMCs für 30 Min. auf Eis markiert. Anschließend wurde 1 mL MACS-Puffer zugefügt und die Suspension ohne Blasenbildung in ein FACS-Röhrchen überführt (max. 8×10^7 Zellen/Röhrchen). Das Röhrchen wurde für 10 Min. in den Imag-Magneten gestellt, währenddessen sich die magnetisch markierten Zellen an der Kontaktfläche des Röhrchens zum Magneten anlagern. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 mL MACS-Puffer resuspendiert und das Röhrchen für 5 Min. in den Imag-Magneten gestellt. Der zuletzt beschriebene Vorgang wurde wiederholt und nach Verwerfen des letzten Überstandes wurden die angereicherten CD4^+ T-Zellen zur Bestimmung der Zellzahl in 1 mL T-Zell-Medium gelöst. Zur Analyse der Reinheit der angereicherten Zellen wurden diese gegen folgende Oberflächenmoleküle gefärbt: anti- CD3 -PerCP, anti- CD4 -APC und anti- CD8 -FITC. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Reinheit aller angereicherten CD4^+ T-Zellen war >95 %.

Naive T-Zellen wurden mit Hilfe des MidiMACS-Systems von Miltenyi angereichert. Dazu wurden PBMCs in 45 μL MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen gelöst und mit 5 μL *naive CD4⁺ T cell biotin-antibody cocktail II* pro 1×10^7 Zellen für 20 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 5 mL MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 5 Min., bei 1500 rpm und 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und 40 μL MACS-Puffer, sowie 10 μL anti-Biotin Microbeads jeweils pro 1×10^7 Zellen zugefügt. Die Suspension wurde für 30 Min. auf Eis inkubiert. Es wurde zweimal mit 5 mL MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 5 Min., bei 1500 rpm und 4 °C) und die Zellen anschließend in 2 mL MACS-Puffer resuspendiert. Eine LS-Säule wurde in den Magneten gesetzt und mit 3 mL MACS-Puffer gespült. Über einen Filter (*Celltrics*, Partec) wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Nachdem die Suspension komplett von der Säule aufgenommen war, wurde der Filter zweimal mit 1 mL MACS-Puffer gespült. Die naiven T-Zellen befanden sich im Durchfluss der Säule. Dieser wurde für 5 Min. bei 1300 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 mL T-Zell-Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Analyse der Reinheit der angereicherten Zellen wurden diese gegen folgende Oberflächenmoleküle gefärbt: anti- CD3 -APC, anti- CD4 -PerCp, anti- CD45RO -PECy7 und anti- CD45RA -FITC. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Rein-

heit aller angereicherten naiven T-Zellen war >80 %.

3.8 Klonierung miR-29a exprimierender Vektoren

3.8.1 Transformation von *Escherichia coli* mit KCM

In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 20 µL 5x KCM (0,5 M KCl + 0,15 M CaCl₂ + 0,25 M MgCl₂ in H₂O) und 100 ng Plasmid-DNA oder 10 µL des Ligationsansatzes vorgelegt, mit H₂O auf 100 µL aufgefüllt und vorsichtig 100 µL kompetente *E. coli* Bakterien (TOP10) zugefügt. Der Transformationsansatz wurde 20 Min. auf Eis und anschließend für 10 Min. bei RT inkubiert. Es wurde für 1 Min. bei RT und 8000 rpm zentrifugiert. 150 µL des Überstandes wurden verworfen und das Pellet im Rest des Überstandes resuspendiert.

Zur Selektion von positiven Bakterienklonen wurde die Suspension auf LB-Agar mit 100 µg/mL Ampicillin ausgestrichen und 16 Std. bei 37 °C inkubiert.

Zur Konservierung transformierter *E. coli* Bakterien wurden 50 µL Transformationsansatz in 1,8 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin 16 Std. bei 37 °C und 1400 rpm inkubiert. 850 µL der Kultur wurden mit 150 µL Glycerol gemischt und bei -20 °C gelagert.

3.8.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

1,8 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin wurden aus Einzelkolonien oder Glycerolstocks angeimpft und 16 Std. bei 37 °C und 1400 rpm inkubiert. Mit Hilfe des *NucleoSpin Plasmid Kits* (Macherey-Nagel) erfolgte die Isolierung der DNA nach Herstellerangaben. Eluiert wurde mit 50 µL H₂O.

Zur Präparation großer Mengen von Plasmid-DNA wurden 100 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin aus einem Glycerolstock angeimpft und 16 Std. bei 37 °C und 1400 rpm inkubiert. Nach Herstellerangaben wurde mit Hilfe des *Plasmid Plus Maxi Kits* (Qiagen) und dem *QIAvac* Vakuumsystem die Plasmid-DNA isoliert und mit 400 µL H₂O eluiert.

3.8.3 Amplifikation und Aufreinigung von DNA-Abschnitten

Zur Amplifikation von DNA-Bereichen wurden spezifische Primer mit den erforderlichen Enzymschnittstellen erstellt und in folgendem Ansatz verwandt:

Ansatz		Programm		
H ₂ O	36,5 µL - x µL	Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec.
5x <i>Phusion</i> HF-Puffer	10 µL	35 Zyklen	98 °C	10 sec.
10 mM dNTPs	1 µL		60 °C	10 sec.
Primer vorwärts (10 µM)	1 µL		72 °C	30 sec.
Pimer rückwärts (10 µM)	1 µL	Finale Elongation	72 °C	5 Min.
<i>Phusion</i> -Polymerase (2 U/µL)	0,5 µL			
DNA (100 ng)	x µL			
Gesamt	50 µL			

Nach der Amplifikations-PCR (*Polymerase-Ketten-Reaktion*) wurden 5 µL des Produkts auf ein 1 % Agarose Gel in TBE-Puffer mit Ethidiumbromid aufgetragen und die DNA für 35 Min. bei 130 V aufgetrennt. Als Marker wurden die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 100 bp Plus Ladder oder Low Range DNA Ladder (alle Fermentas) verwandt.

Zur Aufreinigung des PCR-Produktes wurde das *NucleoSpin Extract II* Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben angewandt und die DNA in 50 µL H₂O eluiert. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrops (Thermo Scientific) bestimmt.

3.8.4 Klonierung von miR-29a in LeGO-Vektoren

Zur exogenen Expression von miR-29a (s. 3.9.2) wurde die Sequenz der humanen, reifen miR-29a mit einem 172 Basenpaarüberhang Richtung 3'-Ende und einem 164 Basenpaarüberhang Richtung 5'-Ende (Sequenz s. Anhang) in verschiedene LeGO-Vektoren kloniert (Abbildung 3.8.1).

Die humane miR-29a Sequenz wurde zunächst mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert (miR-29a_fw, miR-29a_rv) und aufgereinigt (s. 3.8.3). Für die Klonierung in den LeGO-iG2 Vektor wurden die Primer miR-29a_BamHI_fw und miR-29a_EcoRI_rv verwandt. Für die Klonierung in den LeGO-G_U6 Vektor wurden die Primer miR-29a_XhoI_fw und miR-29a_NotI_rv verwandt. Durch die Amplifikation wurden gleichzeitig die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI bzw. XhoI und NotI an die DNA-Sequenz angefügt. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 406 Basenpaaren (bp). Die Vektoren und das PCR-Produkt wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (LeGO-iG2: BamHI, EcoRI; LeGO-G_U6: XhoI, NotI, alle *FastDigest*, Fermentas) in folgenden Ansätzen geschnitten:

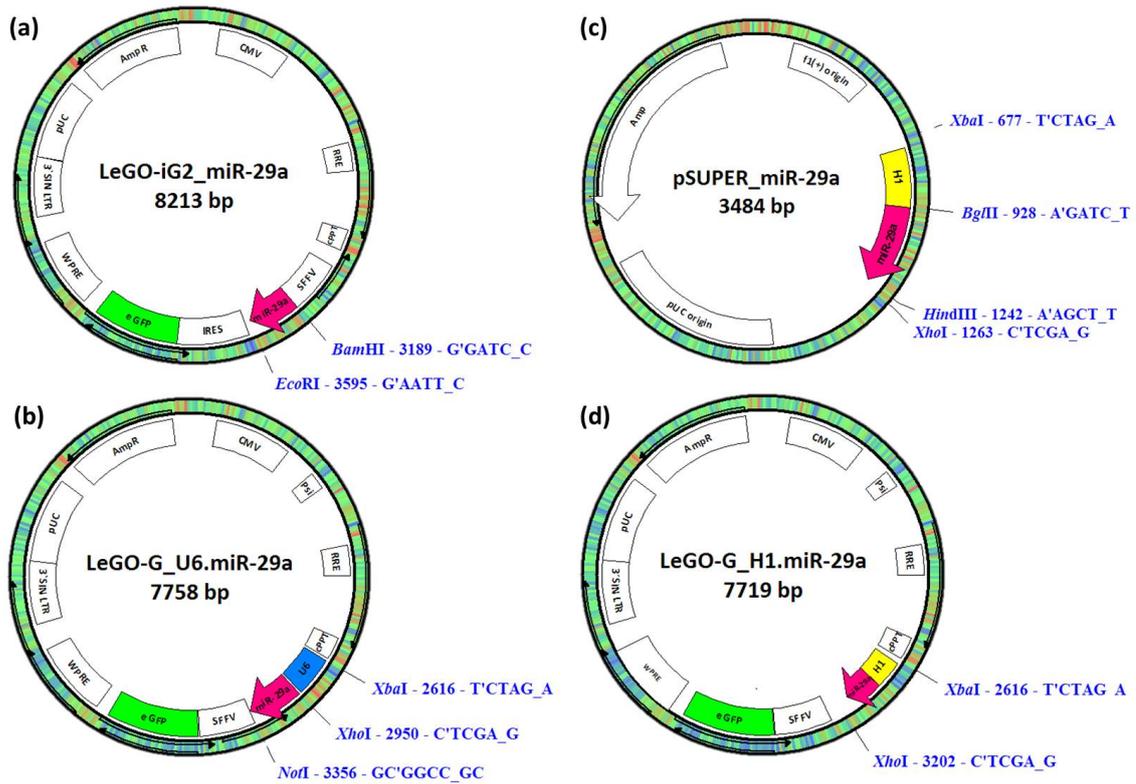


Abbildung 3.8.1: Vektorkarten der verwandten LeGO-Vektoren und pSUPER. Restriktionsschnittstellen = blau, humane miR-29a Sequenz mit 3'- und 5'-Überhang = pink, eGFP = grün, U6-Promotor = hellblau, H1-Promotor = gelb. Vektorkarten von (a) LeGO-iG2_miR-29a, (b) LeGO-G_U6.miR-29a, (c) LeGO-G_H1.miR-29a und (d) pSUPER_miR-29a. Dargestellt sind die zur Klonierung verwandten Restriktionsschnittstellen.

Restriktionsansätze

PCR-Produkt	LeGO-Vektor	Inkubation
FastDigest Puffer	2 μ L	37 °C 15 Min.
Restriktionsenzym I	1 μ L	82 °C 5 Min.
Restriktionsenzym II	1 μ L	
DpnI	1 μ L	
miR-29a DNA	25 μ L	
Gesamt	30 μ L	
	LeGO-Vektor	Inkubation
	FastDigest Puffer	2 μ L 37 °C 15 Min.
	Restriktionsenzym I	1 μ L 82 °C 5 Min.
	Restriktionsenzym II	1 μ L
	Vektor-DNA	x μ L
	H ₂ O	16 - x μ L
	Gesamt	20 μ L

Dabei wurde die DNA-Menge des Vektors an die verwandte DNA-Menge des PCR-Produktes angepasst. Anschließend erfolgte die Ligation der DNA von miR-29a in den LeGO-Vektor mit Hilfe des *Rapid DNA Ligation Kit* (Fermentas) für 5 Min. bei RT. Zur Expression der generierten Plasmide wurden kompetente *E. coli* Bakterien (*TOP10*) mit Hilfe der KCM-Methode transformiert und auf Ampicillin-haltigem LB-Agar selektioniert (s. 3.8.1). Nach Isolierung der Plasmid-DNA wurden positive Klone mittels Restriktionsverdau mit BamHI, und EcoRI (LeGO-iG2, 406 bp) bzw. XhoI und NotI (LeGO-G_U6, 406 bp) identifiziert und durch Sequen-

zierung bestätigt.

Promotoraustausch in LeGO-G_U6

Zum Austausch des murinen U6-Promotors in LeGO-G_U6 gegen einen humanen H1-Promotor wurde der von Brummelkamp et al. entwickelte pSUPER Vektor verwandt [145]. Der Vektor wurde ursprünglich zur Synthese von *small interfering RNAs* in Säugerzellen entwickelt und trägt den humanen H1-Promotor. Aufgrund gleicher Restriktionsschnittstellen (XbaI, XhoI) um den H1-Promotor in pSUPER und um den U6-Promotor in LeGO-G_U6 (Abbildung 3.8.1 (b) und (d)), ist ein einfacher Austausch der Promotoren möglich.

Um die Expression von miR-29a unter dem H1-Promotor zu erreichen wurde zunächst die DNA-Sequenz der humanen, reifen miR-29a in pSUPER kloniert. Dazu wurde die miR-29a Sequenz aus dem LeGO-G_miR-29a Vektor mit Hilfe der Primer miR-29a_100 bp flank_BglII_fw und miR-29a_100 bp flank_HindIII_rv amplifiziert. Die Anzahl der die reife miR-29a Sequenz umgebenden Nukleotide wurde hierbei auf 100 bp reduziert. Durch die Amplifikation wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BglII und HindIII an die DNA-Sequenz angefügt. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 314 bp. Der Vektor und das PCR-Produkt wurden mit den Restriktionsenzymen BglII und HindIII (Ansatz s. oben: *Restriktionsansätze*) geschnitten. Dabei konnte der pSUPER Vektor nicht gleichzeitig mit beiden Enzymen geschnitten werden. Die Schnittstellen der beiden Enzyme liegen so nah beieinander, dass es zu einer sterischen Hinderung kommen würde. Anschließend erfolgte die Ligation (*Rapid DNA Ligation Kit*, Fermentas) und Transformation in *E. coli* (s. 3.8.1). Nach Identifizierung positiver Klone (EcoRI, HindIII: 535 bp und 2949 bp) wurde Plasmid-DNA (pSUPER_miR-29a) isoliert (s. 3.8.2). LeGO-G_U6 und pSUPER_miR-29a DNA wurden mit den Enzymen XbaI und XhoI geschnitten und anschließend über ein Agarose Gel präparativ mit Hilfe des *NucleoSpin Extract II Kits* (Machery-Nagel) aufgereinigt (H1.miR-29a: 586 bp; LeGO-G_U6: 7133 bp, s. Abbildung 3.8.1 (c)). Nach Ligation der zwei DNA-Bereiche und anschließender Transformation in *E. coli* (s. 3.8.1) wurden positive Klone auf einem Ampicillin-haltigen Selektionsagar (XbaI, XhoI: 586 bp, 7133 bp, s. Abbildung 3.8.1 (d)) identifiziert und mittels Sequenzierung bestätigt.

3.9 Exogene Expression von miR-29a durch lentivirale Transduktion

Unter Transduktion wird der Gentransfer mit Hilfe viraler Vektoren in eine Zielzelle verstanden. In dieser Arbeit wurden hierfür so genannte LeGO- (*Lenitviral Gene Ontology*) Vektoren verwandt [146] (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Fehse, UKE Hamburg). Es handelt sich hierbei um ein retrovirales System, welches auf lentiviralen HI-Viren basiert. Das System führt zum stabilen Einbau eines Gens in das Genom der Zielzelle. Allerdings sind diese transgenen Viruspartikel nur noch infektiös und nicht mehr replikationsfähig. Deshalb muss das Expressionsplasmid (LeGO-Vektor) zusammen mit Plasmiden, welche für struktu-

relle und regulatorische Proteine kodieren (s. Abbildung 3.9.1: gag/pol, rev, env), transfiziert werden. Durch eine so genannte Verpackungszelllinie (hier HEK293T Zellen) werden infektiöse Viruspartikel gebildet. Die in dieser Arbeit verwandten LeGO-Vektoren exprimieren als Nachweisgen das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP). Transduzierte Zellen können so mit Hilfe der Durchflusszytometrie identifiziert werden. Als Kontrollplasmid wurde der LeGO-G2 Vektor verwandt. LeGO-iG2 konnte nicht als Kontrolle verwandt werden, da ein Gen unter der Kontrolle einer IRES ohne vorgeschaltetes Gen nur sehr ineffizient exprimiert wird.

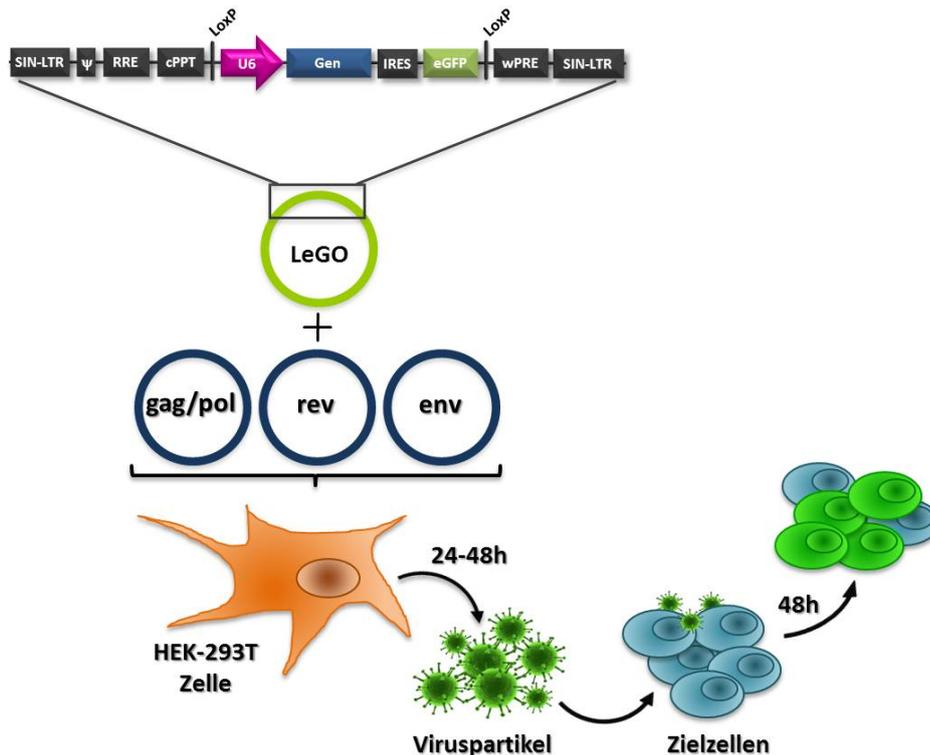


Abbildung 3.9.1: Verlauf der lentiviralen Transduktion. Schematische Darstellung des Verlaufes der lentiviralen Transduktion. Eine Verpackungszelllinie wird mit dem für das Zielgen kodierenden Expressionsvektor (LeGO-Vektor) zusammen mit Vektoren, welche für strukturelle und regulatorische Proteine der Viren kodieren (gag/pol, rev, env) transfiziert. Nach 24 - 48 Std. können infektiöse, jedoch nicht-replikationsfähige Viren aus dem Überstand der HEK293T Zellen geerntet werden. Die Zielzellen werden mit den Viruspartikeln infiziert, wodurch es zum stabilen Einbau des Zielgens in das Genom der Zielzelle kommt. Anschließend exprimieren die transduzierten Zielzellen das Zielgen und das Nachweisgen (eGFP). LTR = *long terminal repeat*, ψ = Verpackungssignal, RRE = *rev responsive element*, cPPT = *central polypurin tract*, IRES = interne ribosomale Eintrittsstelle, wPRE = *woodchuck posttranscriptional regulatory element*, gag = *group antigen* (Polyprotein), pol = reverse Transkriptase, env = *envelope protein*. (modifiziert aus [100]).

3.9.1 Kultur von HEK293T Zellen

Bei der immortalisierten, adhärennten Zelllinie HEK293T handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen (*Human Embryonic Kidney*), welche zusätzlich das *SV40 large T-Antigen* exprimieren. Im Rahmen der lentiviralen Transduktion wurde diese Zelllinie als Verpackungszelli-

nie zur Generierung viraler Partikel genutzt. Für die Kultivierung der HEK293T Zellen wurden 10 cm Zellkulturschalen (Sarstedt) und HEK-Medium verwandt. Zu Beginn wurden die Zellen zu 2×10^6 Zellen/mL ausgesät. Anschließend wurden die Zellen alle zwei Tage im Verhältnis 1:10 verdünnt. Dafür wurde zunächst das Medium von den adhären Zellen abgenommen. Die Zellen wurden vorsichtig mit 5 mL angewärmtem (37 °C) PBS gewaschen und mit 1,5 mL angewärmten Trypsin-EDTA (GIBCO) abgelöst. Zum Ablösen der Zellen wurde die Zellkulturschale vorsichtig geklopft. Durch pipettieren wurden die Zellen vereinzelt und mit Zugabe von 8,5 mL HEK-Medium die Trypsinaktivität gestoppt. Zur weiteren Kultur wurde 1 mL der Zellsuspension mit 9 mL HEK-Medium gemischt. Maximal 30 Passagen wurden durchgeführt.

3.9.2 Generierung lentiviraler Infektionspartikel

Zur Herstellung lentiviraler Infektionspartikel wurden 5×10^6 HEK293T Zellen in einer 10 cm Kulturschale ausgesät und 16 Std. kultiviert. Mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode wurden die Zellen anschließend mit den Expressionsvektoren für Kontroll- oder Zielgen und den Vektoren für strukturelle und regulatorische Proteine transfiziert.

Plasmid	Menge pro Schale
Expressionsvektor (Zielgen)	20 µg
Expressionsvektor (Kontrollgen)	10 µg
pMDLg/pRRE (gag/pol)	10 µg
pRSV-Rev (rev)	5 µg
phCMV-GALV-C _{4070A} (env)	5 µg

Dazu wurden die Vektoren in 450 µL H₂O verdünnt und anschließend 50 µL Calciumchlorid (CaCl₂, 2,5 M) zugefügt. Die Lösung wurde durch pipettieren gemischt, unter "blubbern" in 500 µL 2x HBS (Sigma-Aldrich) getropft und anschließend 20 Min. bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium aus der Schale der HEK293T Zellen entnommen und durch 8 mL frisches HEK-Medium mit 25 mM Chloroquin ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde zu den HEK-Zellen getropft und nach 6 Std. Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium gegen 8 mL frisches HEK-Medium ohne Chloroquin ausgetauscht. 24 Std. später wurde der erste, Viruspartikel-enhaltende Überstand geerntet und steril filtriert (*low protein-binding* Sterilfilter (Millipore)). Es wurde 8 mL frisches HEK-Medium auf die Zellen gegeben und nach weitere 24 Std. der zweite Virusüberstand abgenommen, steril filtriert und bei -80°C eingefroren. Die HEK293T Zellen wurden anschließend entsorgt.

Um die Konzentration der Viruspartikel in der Überständen zu bestimmen wurden HEK293T Zellen mit verschiedenen Mengen des Überstandes infiziert. In einer 24well Platte wurden HEK293T Zellen zu 5×10^4 Zellen/well in 500 µL HEK-Medium ausgesät. Zur Adhäsion wurden die Zellen 2 - 5 Std. bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Es wurde 8 µg/mL Polybren und

der Virusüberstand in Mengen von 0,5 μL , 1 μL , 5 μL und 50 μL pro *well* zugefügt. Die Zellen wurde 1 Std. bei 2200 rpm und RT zentrifugiert und anschließend für 6 - 24 Std. bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium der Zellen wurde gegen 1 mL frisches HEK-Medium ohne Polybren ausgetauscht und nach 3-tägiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit 150 μL Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) abgelöst. Durchflusszytometrische wurden die eGFP⁺ HEK293T Zellen quantifiziert und deren mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in 50 μL Zellsuspension bestimmt. 100 μL der Zellsuspension wurde für die Analyse der miRNA Expression (s. 3.11) verwandt. Beide Analysen dienten der Überprüfung der Funktionalität der Expressionsvektoren.

Mit Hilfe folgender Formel konnte anschließend auf Basis der eingesetzten Zellzahl, dem Anteil transduzierter Zellen (eGFP⁺) und des Volumens des eingesetzten Virusüberstandes der Virustiter bestimmt werden:

$$\text{Infektiöse Einheiten/mL} = \frac{\text{Anzahl ausgesäter Zellen} \times \text{Anteil transduzierter Zellen}}{\text{Volumen des eingesetzten Virusüberstandes}}$$

3.9.3 Transduktion von CD4⁺ T-Zellen mit lentiviralen Partikeln

Primäre, humane CD4⁺ T-Zellen wurden mit Hilfe von MACS (s. 3.7) aus PBMCs (s. 3.2) gesunder Spender angereichert und anschließend T-Zellrezeptor-spezifisch stimuliert. Dazu wurden 1 x 10⁵ T-Zellen mit 2 μL anti-CD3/28 Dynabeads und 20 U/mL IL-2 in 200 μL T-Zellmedium in einer 96*well* Rundbodenplatte für zwei Tage bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Zur Durchführung der Transduktion mussten zunächst die *wells* einer 24*well* Platte (Falcon) mit Retronektin (9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet werden. Dazu wurden pro *well* 18 μg Retronektin in 500 μL PBS gelöst und für 2 Std. bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter Parafimverschluss im *well* inkubiert. Anschließend wurde die Retronektin-Lösung abgenommen, 500 μL Block-Lösung zugefügt und für 30 Min. bei RT inkubiert. Nachdem mit 600 μL Waschlösung gewaschen wurde, wurden die *wells* mit Viruspartikeln beladen. Dazu wurden die hergestellten Virusüberstände (s. 3.9.2) im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und das Volumen entsprechend einer *multiplicity of infection* (MOI) von 10 in die *wells* gegeben. Es wurde 1 Std. bei 2200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die *wells* wurden mit mindestens 250 μL , maximal 750 μL Virusüberstand beladen. Zur Berechnung der MOI musste berücksichtigt werden, dass mit jedem Beladungsschritt 50 % der Viruspartikel an die Oberfläche der *wells* binden. Bei einer MOI von 10 wurden für 2,5 x 10⁵ T-Zellen damit 5 x 10⁶ Viruspartikel benötigt. Die zuvor aktivierten T-Zellen wurden in ein 15 mL Falcon überführt, 5 Min. bei RT und 1500 rpm zentrifugiert und zur Bestimmung der Zellzahl (s. 3.3) in 1 mL T-Zellmedium resuspendiert. Anschließend wurden die T-Zellen zu 2,5 x 10⁵ Zellen/24*well* in 500 μL T-Zellmedium mit 20 U/mL IL-2 auf die Virus- und Retronektin-beschichteten *wells* gegeben. Nachdem die T-Zellen für 24 Std. bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert wurden, wurden die Zellen resuspendiert, in ein 15 mL Röhrchen überführt und

für 5 Min. bei 1500 rpm und RT zentrifugiert. Je ein *24well* wurde anschließend in sechs *96wells* überführt. Dazu wurden die Zellen in 1,2 mL vorgewärmten T-Zellmedium mit 20 U/mL IL-2 resuspendiert und zu 200 μ L/*96well* in Kultur genommen (37°C, 5 % CO₂).

Zwei Tage nach der Transduktion wurde die T-Zellen durchflusszytometrisch bezüglich der Expression von eGFP analysiert. Bei der Transduktion von T-Zellen wurden neben dem Zielgen (miR-29a)-kodierenden Expressionsvektor zwei Expressionkontrollen verwandt. Zum einen eine Positivkontrolle, bei welcher der Expressionsvektor konstitutiv eGFP exprimiert (im Folgenden *Kontrolle* genannt), zum anderen eine Negativkontrolle, in welcher die Zellen nicht mit Virusüberstand behandelt wurden (im Folgenden *untransduziert* genannt).

3.10 Inhibition der miR-29a Expression mit Hilfe von Antagomirs

Antagomirs sind chemisch synthetisierte Oligonukleotide, welche aufgrund von Sequenzübereinstimmungen über Basenpaarung die Funktionalität von microRNAs inhibieren. Der Einsatz solcher Antagomirs kann damit den Funktionsverlust spezifischer miRNAs nachahmen, so dass die Auswirkung auf potentielle Zielgene untersucht werden kann.

Bei der Inhibition der endogenen Expression von miR-29a in primären, humanen PBMCs wurden die *miRIDIAN* Produkte von Dharmacon verwandt. Als Kontrollen dienten dabei eine untransfizierte Probe, eine Positivkontrolle, eine Negativkontrolle, sowie eine Transfektionskontrolle. Bei der Positivkontrolle wurde als Ziel-miRNA eine gut konservierte, in vielen humanen Zelllinien exprimierte miRNA (miR-16) verwandt. Die Negativkontrolle hatte als Ziel eine miRNA des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-67). Diese miRNA weist die minimalste Sequenzübereinstimmungen mit humanen miRNAs auf. Bei der Transfektionskontrolle handelt es sich ebenfalls um die Antagomir gegen cel-miR-67, welche zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dy457 gekoppelt ist.

Zur Transfektion von T-Zellen mit Antagomirs wurden in einer *96well* Platte frisch isolierte PBMCs (s. 3.2) zu $1,5 \times 10^5$ Zellen/*well* mit 2 μ L anti-CD3/28 Dynabeads, in T-Zellmedium ohne Antibiotikum ausplattiert. Es wurde für 16 Std. bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend transfiziert. Dazu wurde eine 5 μ M Lösung der Antagomir-29a und der Kontroll-Antagomirs in siRNA-Puffer (Dharmacon) hergestellt (im Folgenden als miRNA-Lösung bezeichnet). Je Antagomir wurden zwei Reaktionsgefäße vorbereitet. In ersten Reaktionsgefäß wurde zu 9 μ L T-Zellmedium 1 μ L miRNA-Lösung gegeben, im zweiten Reaktionsgefäß wurden zu 9,5 μ L T-Zellmedium 0,5 μ L DharmaFECT 4 (DF4) gegeben. Es wurde für 5 Min. bei RT inkubiert. Der Inhalt des ersten Reaktionsgefäßes wurde in das zweite Reaktionsgefäß überführt und die Transfektionslösung aus T-Zellmedium, miRNA-Lösung und DF4 wurde für 20 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde 80 μ L T-Zellmedium zugefügt. Die stimulierten Zellen wurden für 5 Min. bei RT und 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgeworfen. 100 μ L der Transfektionslösung wurden ins *well* mit den zu transfizierenden Zellen gegeben

und die Zellen für 48 Std. bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Analyse der Zytokinexpression der transfizierten Zellen, wurde 50 µL Zellsuspension restimuliert (s.) und durchflusszytometrisch analysiert. Für die Analyse der miRNA-Expression (s. 3.11) wurden 500 µL Zellsuspension verwandt.

3.11 Isolation und Analyse von microRNAs

Die Isolierung von miRNAs erfolgte aus PBMCs, angereicherten T-Zellen oder HEK293T Zellen mit Hilfe des *microRNA Isolation Kit* (Ambion) nach Herstellerangaben. Für Probenmaterial von TB-Patienten und Kontrollen aus Ghana wurde die miRNA Isolation von A. Afum-Adjei Awuah am KCCR durchgeführt. Die reverse Transkription und qPCR erfolgte anschließend durch mich.

3.11.1 Isolation von miRNAs

Mindestens $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden pelletiert (Zentrifugation für 5 Min. bei 1500 rpm und 4 °C) und in 600 µL *Lysis/Binding Solution* resuspendiert. Nach Zugabe von 60 µL *miRNA Homogenate Additive* wurde die Suspension für 10 Min. bei RT inkubiert. Es wurden 660 µL Phenol:Chloroform zugefügt und die Suspension für 45 Sek. gemischt. Zur Phasentrennung wurde für 5 Min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und anschließend die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurde das 1,25-fache Volumen der wässrigen Phase an Ethanol zugefügt und das Gemisch auf die Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation für 30 Sek. bei 10.000 rpm und RT wurde der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde einmal mit 700 µL *Wash Solution 1* und anschließend zweimal mit *Wash Solution 2/3* gewaschen (Zentrifugation für 30 Sek. bei 10.000 rpm und RT). Zum Trocknen der Säule wurde 1,5 Min. bei 10.000 rpm und RT zentrifugiert und anschließend die gesamte RNA mit 100 µL H₂O eluiert.

3.11.2 Analyse der miRNA Expression

Zum Nachweis der miRNA Expression mittels *real-time* PCR (qPCR) wurden zwei Ansätze verwandt. Zum Einen wurde die miRNA-Expression in einem *96well Platten-Assay* nachgewiesen, zum Anderen wurde die miRNA-Expression in *Einzelassays* nachgewiesen. Für die *96well Plattenassay* wurde 500 ng der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) und für die *Einzelassays* wurde 100 ng der isolierten RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde eine reverse Transkription mit einer *Pool* spezifischer TaqMan™ Primer (*96well Platten-Assay*) oder einzelner spezifischer TaqMan™ Primer (*Einzelassays*) für die zu analysierenden miRNAs durchgeführt. Die Primer wurden kommerziell von Applied Biosystems erworben und in folgenden Ansätzen verwandt:

Ansatz 96well Plattenassay		Programm	
H ₂ O	8,6 µL - x µL	16 °C	30 Min.
10x RT Puffer	1,5 µL	42 °C	30 Min.
25 mM MgCl ₂	1,8 µL	85 °C	5 Min.
100 mM dNTPS	0,4 µL		
RNase Inhibitor (20 U/mL)	0,2 µL		
MultiScribe RT (50 U/mL)	1,5 µL		
TaqMan TM Primerpool A/B	1 µL		
RNA (500 ng)	x µL		
Gesamt	15 µL		

Ansatz Einzelassay		Programm	
H ₂ O	9,66 µL - x µL	16 °C	30 Min.
10x RT Puffer	1,5 µL	42 °C	30 Min.
100 mM dNTPS	0,15 µL	85 °C	5 Min.
RNase Inhibitor (20 U/mL)	0,19 µL		
MultiScribe RT (50 U/mL)	0,5 µL		
TaqMan TM 5x miRNA spez. RT Primer	3 µL		
RNA (100 ng)	x µL		
Gesamt	15 µL		

Die Quantifizierung der miRNA Expression wurde mit Hilfe von spezifischen TaqManTM Primern mit Sonden (Applied Biosystems) für die einzelnen miRNAs durchgeführt. Im *96well Platten-Assay* waren die Primer bereits in den einzelnen *wells* enthalten. Bei den *Einzelassays* wurden die Primer dem qPCR Ansatz zugefügt. Es wurden dabei Doppelwerte in folgenden Ansätzen bestimmt:

Ansatz 96well Plattenassay		Programm	
H ₂ O	9,85 µL	16 °C	30 Min.
TaqMan 2x Universal MM	10 µL	40 Zyklen	95 °C 15 Sek.
cDNA	0,15 µL	60 °C	60 Sek.
Gesamt	20 µL		

Ansatz Einzelassay		Programm	
H ₂ O	8 µL		16 °C 30 Min.
TaqMan 2x Universal MM	10 µL	40 Zyklen	95 °C 15 Sek.
TaqMan 20x miRNA spez. qPCR Primer	1 µL		60 °C 60 Sek.
cDNA	1 µL		
Gesamt	20 µL		

3.11.3 Analyse der pre-miR-29a Expression

Zur Analyse der pre-miR-29a Expression wurde die gesamte RNA aus den zu analysierenden Zellen isoliert (s. 3.11.1). Dazu wurden Primer verwendet, welche im Übergangsbereich der Sequenz von pri- und pre-miR29a binden. Anschließend wurde eine reverse Transkription und eine qPCR mit Hilfe von *SYBRGreen* durchgeführt. Für die reverse Transkription wurde 1 µg RNA eingesetzt. Nach dem unten dargestellten Ansatz wurden zunächst RNA und Primer für 5 Min. bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden alle weiteren Reagenzien zugefügt und entsprechend des unten aufgeführten Programms inkubiert.

Ansatz reverse Transkription		Programm	
H ₂ O	11 - x µL	42 °C	60 Min.
5x Puffer	4 µL	70 °C	15 Min.
10 mM dNTPs	2 µL		
M-Mulv (200 U/mL) (1:10)	1 µL		
RNA (1 µg)	x µL		
Oligo dT ₁₈ Primer (0,5 µg/µL)	2 µL		
Gesamt	20 µL		

Für die qPCR wurde 5 ng cDNA pro PCR-Ansatz eingesetzt. Als internes Kontrollgen wurde β -Actin verwendet. Die qPCR wurde in folgenden Ansatz durchgeführt:

Ansatz		Programm	
10x PCR Puffer	1,5 μ L		16 °C
MgCl ₂	1,1 μ L	40 Zyklen	95 °C
10 mM dNTPs	0,3 μ L		60 °C
SYBRGreen (1:1000)	0,15 μ L		
Primer <i>forward</i> (10pM)	2 μ L		
Primer <i>reverse</i> (10pM)	2 μ L		
cDNA (5 ng)	x μ L		
H ₂ O	7,875 μ L		
Gesamt	15 μ L		

3.12 Klonierung von T-Zellen mittels Einzelzellsortierung

Zur Generierung von T-Zellklonen diente die Einzelzellsortierung. Als T-Zellklon wird eine T-Zellpopulation bezeichnet, welche *in vitro* aus einer einzelnen Vorläuferzelle hervorgegangen ist. T-Zellklone weisen spezifische Zytokinprofile auf, anhand derer sie zu den unterschiedlichen T_H-Zellpopulationen (T_H1, T_H2, T_H17, etc.) zugeordnet werden können. Die Einzelzellsortierung bietet die Möglichkeit der Unterscheidung nach Oberflächenmarkern während der Sortierung. Generiert wurden die T-Zellklone aus CD4⁺CD161⁺ T-Zellen. Im humanen System sind diese Zellen als Vorläuferpopulation der T_H17-Zellen beschrieben [147]. Bei der Klonierung dieser T-Zellen kann so der Anteil IL-17⁺ T-Zellklone signifikant gesteigert werden [148].

Für die Klonierung von T-Zellen wurden zunächst 2×10^7 PBMCs eines gesunden Spenders pelletiert (Zentrifugation für 5 Min. bei 1500 rpm und 4 °C) und anschließend für 30 Min. bei 4 °C und im Dunkeln mit anti-CD4 APC-H7 und anti-CD161 FITC im Residualvolumen gefärbt. Die Zellen wurden mit 2 mL T-Zellmedium gewaschen (Zentrifugation für 5 Min. bei 1500 rpm und 4 °C), erneut in 2 mL T-Zellmedium resuspendiert und über einen Filter für Einzelzellsuspensionen (*CellTrics* 50 μ m, Partec) filtriert.

Für die Kultivierung der sortierten Einzelzellen werden Antigen-präsentierende Zellen (APZ) benötigt. Die APZ dienen der Simulation einer "natürlichen, zellulären Umgebung" und bieten neben der Kostimulation auch die Expression von Zytokinen. Durch γ -Bestrahlung kommt es zum Stillstand des Wachstums dieser Zellen, so dass ausschließlich die sortierten Zellen proliferieren.

1×10^8 PBMCs des gleichen oder eines weiteren Spenders wurden mit radioaktiver γ -Strahlung (¹³⁷Cs) für 600 Sek. bestrahlt. Die Zellen wurden zu $5,6 \times 10^5$ Zellen/mL mit 1,11 μ L anti-CD3/CD28 *Dynabeads* (Invitrogen) und 20 U/mL IL-2 in T-Zellmedium resuspendiert. 180 μ L dieser Suspension wurde in den inneren 60 *wells* einer *96well* Rundbodenplatte vorgelegt. Um Verdunstung des Mediums im Inkubator zu minimieren wurden die äußeren *wells* mit 200 μ L

PBS pro *well* befüllt. Anschließend erfolge die Sortierung der CD4⁺CD161⁺ Einzelzellen zu 1, 2, 3, 5 und 10 Zellen/*well* mit Hilfe des FACS Aria III (BD Biosciences) (Reinheit > 90 %). Dabei wurden jeweils 2, 4, 4, 4 und 2 *96well* Platten sortiert. Anschließend wurden die Zellen für sieben Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 20 U/mL IL-2 in jedes *well* und weitere sieben Tage Inkubation bei 5 % CO₂ und 37 °C. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurde jedes *well* auf einen wachsenden T-Zellklon untersucht. Analysiert wurden nur Klone, welche auf Platten wuchsen, die < 37 % positive *wells* aufwiesen. Nur auf diesen Platten kann statistisch davon ausgegangen werden, dass der entstandene T-Zellklon aus einer einzelnen Vorläuferzelle gewachsen ist. Die Analyse der T-Zellklone bezüglich ihres Zytokinprofils erfolgte nach Restimulation mit PMA/Ionomycin und intrazellulärer Färbung mit folgenden Antikörpern: anti-CD40L APC-eFluor780 (0,5 µL, eBiosciences), anti-TNF α AlexaFluor700 (0,01 µL, BD Biosciences), anti-IFN γ PE-Cy7 (0,5 µL, BD Biosciences), anti-IL-17 V450 (0,2 µL, BD Biosciences) und anti-IL-4 PE (0,075 µL, BD Biosciences). Anschließend wurde in ausgewählten Klonen die miRNA Expression bestimmt (siehe 3.11).

3.13 *In vitro* Stimulation von primären humanen T-Zellen

3.13.1 Kurzzeitstimulation zur Bestimmung des Zytokinprofils (Restimulation)

Im *well* einer *96well* Rundbodenplatte wurden 5×10^4 - 2×10^5 Zellen in 200 µL T-Zellmedium mit 10 ng/mL Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und 1 µg/mL Ionomycin resuspendiert. Um die Sekretion der Zytokine zu verhindern wurde gleichzeitig 1 mg/mL Brefeldin zugefügt und die T-Zellen 16 Std. bei 5 % CO₂ und 37 °C stimuliert. Anschließend wurde eine intrazelluläre Färbung der T-Zellen durchgeführt (siehe 3.6). Die Färbung erfolgte mit folgenden Antikörpern: anti-CD40L APC-eFluor780 (0,5 µL, eBioscience), anti-TNF α AlexaFluor700 (0,01 µL, BD Biosciences), anti-IFN γ PE-Cy7 (0,5 µL, BD Biosciences), anti-IL-4 PE (0,075 µL, BD Biosciences) und anti-IL-17 V450 (0,2 µL, BD Biosciences).

3.13.2 Stimulation zur Bestimmung der miRNA Expressionskinetik

2×10^5 Zellen naive T-Zellen wurden in ein *well* einer *96well* Rundbodenplatte gegeben und für drei, fünf und sieben Tage mit anti-CD3/28 *Dynabeads* stimuliert. Als Kontrolle diente ein unstimulierter Ansatz. Nach Stimulation wurden die Zellen pelletiert (Zentrifugation für 5 Min. bei 1500 rpm und 4 °C) und mit 1 mL PBS gewaschen (Zentrifugation für 5 Min. bei 1500 rpm und 4 °C). Es wurde direkt die miRNA Expression analysiert (siehe 3.11) oder die Zellen bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

3.14 Einzelzellsortierung zur Isolierung von T-Zellsubpopulationen

1×10^8 PBMCs wurden für 5 Min. bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert und im Residualvolumen mit folgenden Antikörpern für 30 Min. im Dunkeln gefärbt: anti-CD4 APC-H7 (5 μ L), anti-CD45RA FITC (10 μ L), anti-CCR7 PE (0,5 μ L) und antiCD3 PerCP (10 μ L). Mit Hilfe des FACS-Aria III (BD Biosciences) wurden gleichzeitig, zu mindestens 2×10^5 Zellen folgenden T-Zellsubpopulationen sortiert: naive T-Zellen (T_{naiv} : CCR7⁺CD45RA⁺), zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{ZG} : CCR7⁺CD45RA⁻), Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EG} : CCR7⁻CD45RA⁻), Effektor-T-Zellen (T_{Eff} : CCR7⁻CD45RA⁺). Anschließend wurden die Zellen pelletiert (Zentrifugation für 5 Min. bei 1500 rpm und 4 °C) und mit 1 mL PBS gewaschen (Zentrifugation für 5 Min. bei 1500 rpm und 4 °C), um die miRNA Expression in den einzelnen Populationen zu analysieren (siehe 3.11)

3.15 Statistische Auswertung

Bei den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten konnte nicht von einer Gleichverteilung ausgegangen werden. Voneinander unabhängige Daten wurden daher mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests analysiert. Bei der Analyse abhängiger Daten wurde der Kruskal-Wallis Test angewandt. Zur Analyse von Korrelationen wurde der Spearman Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde durch folgende p-Werte dargestellt:

$p > 0,1$	nicht signifikant
$p \leq 0,1$	Tendenz
$p \leq 0,05$	*
$p \leq 0,01$	**
$p \leq 0,001$	***

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wird die Identifizierung von Kandidaten-miRNAs mit einer differentiellen Expression bei einer aktiven Tuberkulose beschrieben. Weiterhin wurden die Kandidaten-miRNAs in T-Zellsubpopulationen nach *in vitro* Stimulation und in T-Zellklonen mit einem distinkten Zytokinprofil näher charakterisiert. Der zweite Abschnitt beschreibt die Identifizierung potentieller Zielgene, sowie die Modulation der Expression der Kandidaten-miRNAs. Der dritte Abschnitt beschreibt die Untersuchung der Kandidaten-miRNAs als Biomarker der Tuberkulose-Erkrankung und Behandlung.

4.1 Identifizierung und Charakterisierung der miRNA Expression bei der Tuberkulose

Die Beteiligung von miRNAs bei Infektionskrankheiten wurde bei viralen Infektionen wie HIV [65] und HCV [66] bereits beschrieben werden. Auch bei bakteriellen Infektionen mit *Helicobacter pylori* [149] oder *Listeria monocytogenes* [68] scheinen miRNAs eine regulatorische Rolle im Zusammenhang mit T-Zellen zu spielen. Über die Beteiligung von miRNAs bei der Regulation der Immunantwort des Wirtes nach einer Infektion mit *M. tuberculosis* ist jedoch wenig bekannt.

4.1.1 Analyse der *ex vivo* miRNA Expression in CD4⁺ T-Zellen von nicht-infizierten Kontrollen, LTBI und TB-Patienten

Zur Identifizierung differentiell exprimierter miRNAs während der T-Zellantwort bei der humanen Tuberkulose wurde zunächst die Expression von 29 miRNAs in CD4⁺ T-Zellen von Spendern mit akuter TB, LTBI und nicht *M. tuberculosis*-infizierten Kontrollen untersucht. Die Auswahl der miRNAs erfolgte durch meinen Betreuer (Prof. Dr. Marc Jacobsen) vor Beginn meiner Arbeit. Die Etablierung der Methode und die initialen Analysen wurde durch Dr. K. Kleinsteuber durchgeführt. Anschließend habe ich das Projekt von Ihr übernommen. Insgesamt wurden sechs TB-Patienten, sieben LTBI und drei nicht-infizierte Kontrollen, welche in Deutschland rekrutiert wurden, in die Studie einbezogen. Die Analyse der miRNA Expression wurde über quantitative *real-time* PCR (qPCR) mit Hilfe eines *96well* Platten Arrays durchgeführt (Details s. Material und Methoden).

Tabelle 4.1: Expressionslevel analysierter miRNAs in nicht-infizierten Kontrollen, LTBI und TB-Patienten aus Deutschland. Dargestellt ist der Median und die Standardabweichung (SD) der $2^{\Delta Ct}$ -Werte der jeweiligen miRNA. Es wurden drei nicht-infizierten Kontrollen, sieben LTBI und sechs TB-Patienten untersucht. Die Ct-Werte wurden auf das *housekeeping* Gen RNU48 relativiert ($2^{\Delta Ct}$ RNU48). TB = Tuberkulose, LTBI = latent *M. tuberculosis*-infiziert, miR = microRNA, nd = nicht detektierbar Ct = cycle threshold.

	Kontrollen		TB		LTBI	
	Median	SD	Median	SD	Median	SD
let-7a	0,0008	0,0006	nd	nd	nd	nd
miR-15a	0,0005	0,0003	0,0003	0,0013	0,0003	0,0008
miR-17-3p	0,1401	0,0311	0,1259	0,0403	0,071	0,02
miR-21	0,0393	0,0161	0,0438	0,0252	0,0121	0,0047
miR-23a	0,00005	0,00005	nd	nd	nd	nd
miR-25	0,0032	0,0005	0,0027	0,0083	0,0015	0,0027
miR-26a	0,0808	0,0409	0,0928	0,0411	0,0148	0,0113
miR-27a	0,0016	0,001	0,0025	0,0054	nd	nd
miR-29a	0,0687	0,0122	0,0815	0,0467	0,0233	0,0137
miR-30a*	0,728	0,0443	0,07	0,0294	0,036	0,0982
miR-98	nd	nd	nd	nd	nd	nd
miR-99b	0,0003	0,0001	nd	nd	nd	nd
miR-101	0,0008	0,0004	0,0014	0,001	nd	nd
miR-106a	0,1478	0,0215	0,1185	0,0455	0,08	0,0222
miR-106b	0,0047	0,0011	0,003	0,0016	0,0018	0,0028
miR-122	nd	nd	nd	nd	nd	nd
miR-126	0,0022	0,0007	0,0011	0,0013	0,0023	0,0055
miR-142-3p	0,8261	0,3628	0,6404	0,417	0,1	0,0909
miR-143	nd	nd	nd	nd	nd	nd
miR-144*	nd	nd	nd	nd	nd	nd
miR-146a	0,3294	0,0417	0,3099	0,1966	0,2069	0,1075
miR-150	2,459	0,7761	3,8087	1,6389	2,0281	1,3939
miR-155*	nd	nd	nd	nd	nd	nd
miR-181a-1	0,001	0,0003	0,0007	0,0009	nd	nd
miR-191	0,1224	0,366	0,0691	0,022	0,0558	0,0526
miR-203	nd	nd	nd	nd	nd	nd
miR-218	nd	nd	nd	nd	nd	nd
miR-223	0,8505	0,7369	0,1425	0,3888	0,1249	0,8014
miR-455-5p	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Die Expressionsanalyse von CD4⁺ T-Zellen der in Tabelle 4.1.1 dargestellten miRNAs zeigte, dass 16 der 29 analysierten miRNAs in den nicht-infizierten Kontrollen, LTBI und TB-Patienten nachweisbar waren. Drei weitere miRNAs (miR-let-7a, miR-23a und miR-99b) waren in allen Kontrollen, jedoch in mindestens zwei LTBI oder TB-Patienten nicht nachweisbar. 11 miRNAs waren weder in den Kontrollen, noch in den LTBI oder TB-Patienten nachweisbar.

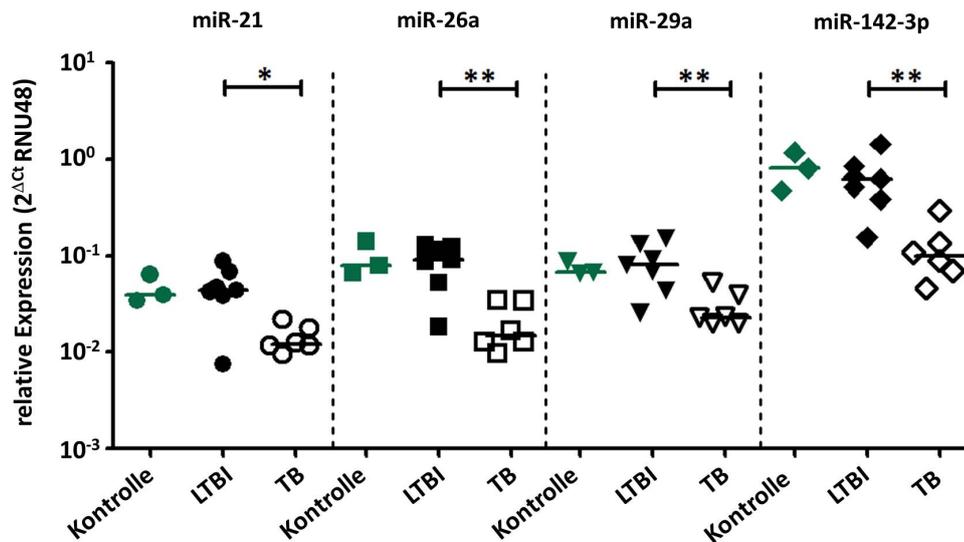


Abbildung 4.1.1: Ex vivo miRNA Expression in CD4⁺ T-Zellen von nicht-infizierten Kontrollen, TB-Patienten und LTBI aus Deutschland. Vergleich der miRNA Expression der differentiell exprimierten miRNAs zwischen nicht-infizierte Kontrollen (grüne Symbole, n = 3), LTBI (ausgefüllte Symbole, n = 7) und TB-Patienten (offene Symbole, n = 6). Dargestellt ist die relative Expression von miR-21 (Kreise), miR-26a (Quadrate), miR-29a (Dreiecke) und miR-142-3p (Rauten) in CD4⁺ T-Zellen. Jedes Symbol stellt einen individuellen Donor dar. Die horizontale Linien zeigen den Median. Die Ct-Werte wurden auf das *housekeeping* Gen RNU48 relativiert ($2^{\Delta Ct}$ RNU48). Unterschiede wurden mittels des nicht parametrischen Mann-Whitney U-Test auf Signifikanzen getestet. Signifikanzen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. TB = Tuberkulose, LTBI = latent *M. tuberculosis*-infiziert, miR = microRNA, Ct = cycle threshold.

Der Vergleich der miRNA Expression in CD4⁺ T-Zellen zwischen TB-Patienten und LTBI ergab Expressionsunterschiede für die miRNAs miR-21, miR-26a, miR-29a und miR142-3p. Für die vier miRNAs wurde in TB-Patienten eine geringere Expression (miR-21: $p = 0,035$, miR-26a: $p = 0,005$, miR-29a $p = 0,008$, miR-142-3p $p = 0,002$) gezeigt. LTBI und nicht-infizierte Kontrollen wiesen vergleichbare Mengen der Kandidaten-miRNAs auf (Abbildung 4.1.1). Alle weiteren, auf dem Platten-Array analysierten 25 miRNAs zeigten keine differentielle Expression. Initiale Analysen zeigten eine Zunahme der Expression der vier Kandidaten-miRNAs unter Therapie in CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten (durchgeführt von Dr. K. Kleinstauber, Daten nicht gezeigt).

Die hier durchgeführte *ex vivo* Analyse der miRNA Expression in CD4⁺ T-Zellen in TB-Patienten und LTBI legen eine Bedeutung von miRNAs, speziell miR-21, miR-26a, miR-29a und miR-142-3p bei der T-Zellantwort während einer aktiven Tuberkulose nahe.

4.1.2 Charakterisierung der Expression der Kandidaten-miRNAs in T-Zellen

Bisherige Forschungsergebnisse zeigen ein breites Spektrum exprimierter miRNAs in T-Zellen, sowie variierende Expressionsprofile zwischen T-Zellentwicklungsstadien und T-Zellsubpopulationen [127, 125, 126]. Zur genauen Charakterisierung der miRNA-Kandidaten wurde deren Expression in T-Zellsubpopulationen und im Zusammenhang mit der Aktivierung und Polarisierung

von T-Zellen analysiert.

Charakterisierung der *ex vivo* Expression von miRNAs in CD4⁺ T-Zellsubpopulationen

Zur Untersuchung von T-Zellsubpopulationen wurden naive (T_{naiv}), Effektor-(T_{Eff}), zentrale Gedächtnis-(T_{ZG}) und Effektor-Gedächtnis-(T_{EG}) T-Zellen mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung angereichert. Anschließend wurden die Expression der Kandidaten-miRNAs mittels qPCR in Einzelassays, unter Verwendung spezifischer TaqMan^(TM) Sonden analysiert.

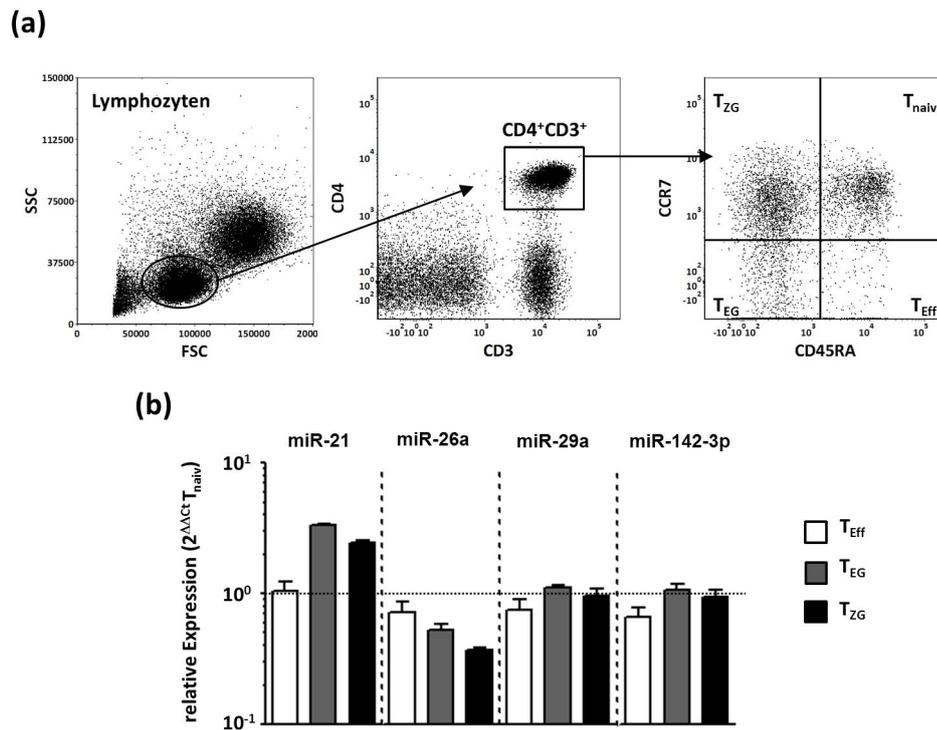


Abbildung 4.1.2: Ex vivo miRNA Expression in T-Zellsubpopulationen. Dargestellt ist der Vergleich der Expression der Kandidaten-miRNAs in naiven (T_{naiv}, offen), Effektor- (T_{Eff}, grau), zentrale Gedächtnis- (T_{ZG}, dunkel grau) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EG}, schwarz). **(a)** Aus den PBMCs wurde anhand von Größe und Granularität (FSC/SSC) die Lymphozytenpopulation ausgewählt, anschließend erfolgte die Auswahl der CD3⁺CD4⁺ Zellpopulation aus welcher die T-Zellsubpopulationen sortiert wurden. **(b)** Via qPCR in Einzelassays wurde die Expression von miR-21, miR26a, miR-29a und miR-142-3p über spezifische TaqMan^(TM) Sonden in den T-Zellsubpopulationen quantifiziert. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel (Doppelwertbestimmung, Median mit Umfangsbereich), in dem nach Relativierung auf das *housekeeping* Gen auf die naiven T-Zellen relativiert ($2^{\Delta\Delta C_t} T_{naiv}$, gepunktete Linie) wurde. Ct = cycle threshold.

Abbildung 4.1.2 (a) zeigt das Vorgehen bei der Auswahl der Zellpopulationen nach Größe und Granularität (FSC/SSC). Anschließend erfolgte die Analyse der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen bezüglich der Expression der Oberflächenmarker CCR7 und CD45RA. In Abbildung 4.1.2 (b) ist die Expression der Kandidaten-miRNAs in den einzelnen T-Zellsubpopulationen relativiert auf naive T-Zellen (gepunktete Linie) gezeigt. Alle vier analysierten miRNAs wurden in den untersuchten T-Zellsubpopulationen exprimiert. Für miR-21 ist beim Vergleich mit T_{naiv} und

T_{Eff} in den T_{EG} und T_{ZG} eine leichte Erhöhung der Expression zu detektieren. MiR-26a dagegen zeigt eine leicht verringerte Expression in T_{EG} und T_{ZG} verglichen mit den T_{naiv} . Für miR-29a und 142-3p zeigte sich in den analysierten T-Zellsubpopulationen keine unterschiedliche Expression.

Insgesamt schwankte die miRNA Expression zwischen den untersuchten T-Zellsubpopulationen und auch interindividuell stark, was auf den Einfluss weiterer Faktoren hindeutet.

Charakterisierung der Expression von miRNAs nach *in vitro* Stimulation naiver T-Zellen.

Über die Regulation der identifizierten miRNA-Kandidaten ist nur sehr wenig bekannt. Daher wurde untersucht, ob die Aktivierung von T_{naiv} einen Einfluss auf die Expression der Kandidaten-miRNAs hat. Für miR-155 ist eine Hochregulation in $CD4^+$ T-Zellen nach Stimulation mit anti-CD3/28 Antikörpern beschrieben [150]. Daher wurde die Expression von miR-155 als Kontrolle mit einbezogen. Nach magnetischer Zellsortierung naiver T-Zellen aus PBMCs erfolgte die *in vitro* Stimulation der Zellen mit anti-CD3/28 Dynabeads für drei bzw. sieben Tage. Anschließend wurde die miRNA Expression mittels qPCR in Einzelassays quantifiziert.

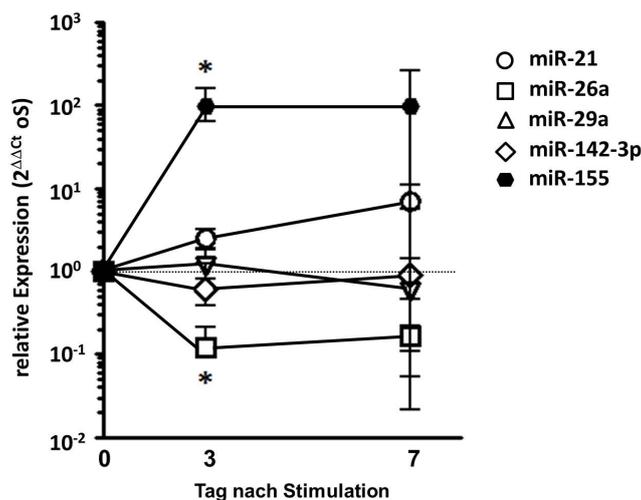


Abbildung 4.1.3: MiRNA Expression nach *in vitro* Stimulation naiver T-Zellen. Analyse der relativen Expression der Kandidaten-miRNAs nach T-Zellrezeptor-spezifischer Stimulation für drei bzw. sieben Tage. Dargestellt ist der Median mit Umfangsbereich aus vier kombinierten Experimenten für die Expression von miR-21 (Kreise), miR-26a (Quadrat), miR-29a (Dreiecke), miR-142-3p (Rauten) und miR-155 (Sechseck) relativiert auf das *housekeeping* Gen RNU48 und anschließend auf die unstimulierte Kontrolle des jeweiligen Tages ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ oS, gepunktete Linie). Analysen in Einzelassays. Signifikanzberechnung mit Hilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Test. Signifikanzen: * $p < 0,05$, Ct = cycle threshold, oS = ohne Stimulus.

Die Stimulation der T_{naiv} induzierte eine signifikant erhöhte Expression von miR-155 ($p = 0,021$) an Tag 3. Diese Erhöhung blieb bis zu Tag 7 konstant (Abbildung 4.1.3, gefülltes Sechseck). Da es sich bei miR-155 um eine eingeführte Positivkontrolle handelt, wurde ein erfolgreicher Verlauf des Experiments angenommen. Die Expression von miR-26a war an Tag 3 signifikant

($p = 0,020$) herunterreguliert und dieses reduzierte Expressionslevel war auch an Tag 7 noch nachweisbar (Abbildung 4.1.3, Quadrate). Die Aktivierung der naiven T-Zellen hatte im Zeitverlauf keinen Einfluss auf die Expression von miR-21, miR-29a und miR-142-3p (Abbildung 4.1.3, Kreise, Dreiecke und Rauten).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression von miR-26a nach T-Zellrezeptor-spezifischer Stimulation naiver T-Zellen herunterreguliert wird.

Charakterisierung der miRNA Expression in T-Zellklonen mit distinktem Zytokinprofil

Zur Untersuchung einer möglichen Rolle der Kandidaten-miRNAs bei der T-Zellpolarisierung wurden T-Zellklone generiert (Details siehe 3.12). Diese wurden anhand ihres Zytokinprofils in T_H1 , T_H17 , $T_H17/1$ T-Zellklone unterteilt werden. Anschließend wurden die T-Zellklone bezüglich der Expression der Kandidaten-miRNAs und miR-155 vor und nach Restimulation mittels qPCR in Einzelassays analysiert.

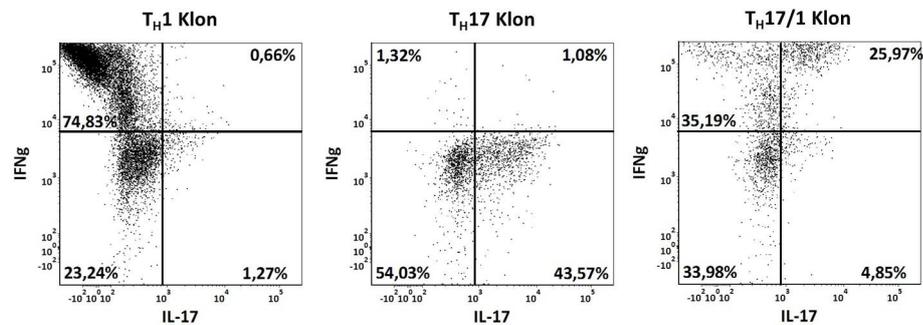


Abbildung 4.1.4: Zytokinprofil von T-Zellklonen. Exemplarische Darstellung des Zytokinprofils von drei T-Zellklonen (T_H1 , T_H17 , $T_H17/1$) nach Restimulation mit PMA/Ionomycin. Alle drei Klone exprimierten $TNF\alpha$ und kein IL-4. T_H = T-Helfer, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat.

Die Bestimmung des Zytokinprofils der generierten T-Zellklone zeigte ein sehr heterogenes Expressionsmuster für die analysierten Zytokine $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-4 und IL-17. $TNF\alpha$ wurde generell exprimiert, so dass sich die T-Zellklone ausschließlich in der Expression von $IFN\gamma$ und IL-17 unterschieden. In Abbildung 4.1.4 ist exemplarisch für drei T-Zellklone das Zytokinprofil bezüglich der Expression von $IFN\gamma$ und IL-17 dargestellt. T-Zellklone mit einem Anteil $> 3\%$ IL-17⁺ und $< 3\%$ $IFN\gamma$ ⁺ Zellen wurden als T_H17 Klone definiert. Klone mit einem Anteil $> 3\%$ $IFN\gamma$ ⁺ und $< 3\%$ IL-17⁺ Zellen wurden als T_H1 Klone definiert und T-Zellklone mit einem Anteil $> 3\%$ $IFN\gamma$ ⁺ und IL-17⁺ Zellen wurden als $T_H17/1$ Klone definiert.

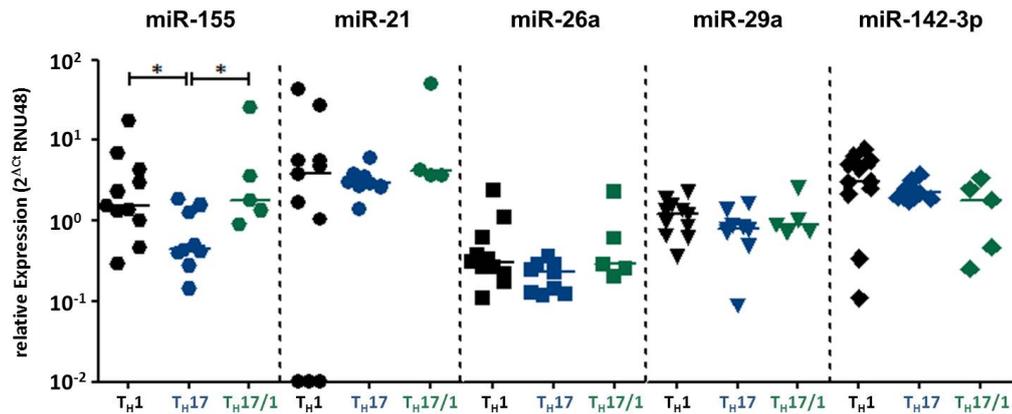


Abbildung 4.1.5: Expression der Kandidaten miRNAs und miR-155 in T-Zellklonen mit distinktem Zytokinprofil. Dargestellt ist der Vergleich der relativen miRNA Expression in T_H1, T_H17 und T_H17/1 Klonen der Kandidaten-miRNAs (miR-21 (Kreise), miR-26a (Quadrate), miR-29a (Dreiecke), miR-142-3p (Rauten)) und miR-155 (Sechsecke). Es wurden zwölf T_H1 (IFN γ ⁺, schwarz), neun T_H17 (IL-17⁺, blau) und fünf T_H17/1 (IFN γ ⁺IL-17⁺, grün) Klone analysiert. Die horizontale Linie stellt den Median dar. Die Ct-Werte wurden auf das *housekeeping* Gen RNU48 relativiert (2^{ΔCt} RNU48). Unterschiede wurden mittels des nicht parametrischen Mann-Whitney U-Test auf Signifikanzen getestet. Signifikanzen: *p<0,05; **p<0,01; Tendenz: p <0,1. T_H = T-Helfer, miR = microRNA, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat.

Für keine der miRNA Kandidaten zeigte sich eine signifikant differentielle Expression zwischen den T_H-Populationen. Allerdings zeigen die Ergebnisse für die miRNA Expression (vor allem für miR-21) große Schwankungen zwischen den einzelnen T-Zellklonen. Die Expression von miR-21 reicht dabei von nicht nachweisbar bis hin zu 2^{ΔCt} RNU48 = 42,51 (Abbildung 4.1.5). Im Mittel sind zwar keine Unterschiede nachweisbar, jedoch sind die Gruppen bei einer derartigen Streuung zu klein, um eine verbindliche Aussage über eine Hoch- oder Herunterregulation der miRNAs machen zu können. Ausschließlich für miR-155 konnte eine erhöhte Expression in T_H1 und T_H17/1 Klonen verglichen mit T_H17 Klonen detektiert werden (p = 0,028 bzw. p = 0,029) (Abbildung 4.1.5).

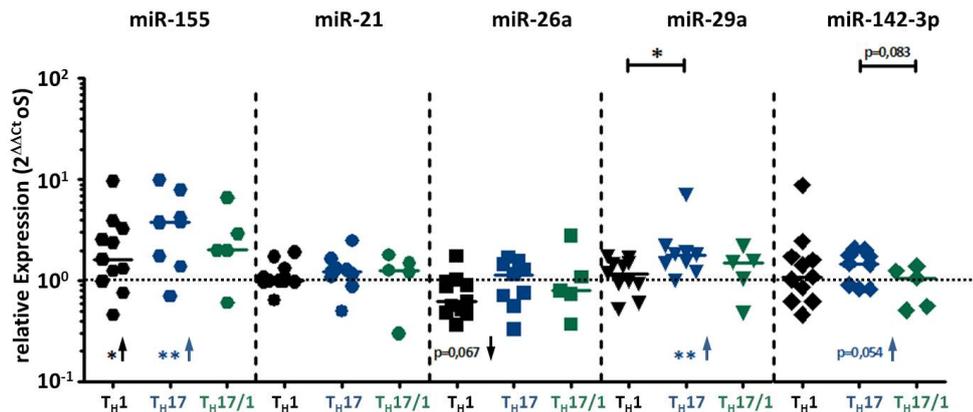


Abbildung 4.1.6: Relative Expression der Kandidaten-miRNAs in T-Zellklonen nach Restimulation.

Vergleich der miRNA Expression nach Restimulation relativiert auf die unstimulierte Kontrolle in T_H1 , T_H17 und $T_H17/1$ Klonen. Analysiert wurden die Kandidaten-miRNAs (miR-21 (Kreise), miR-26a (Quadrate), miR-29a (Dreiecke), miR-142-3p (Rauten)) und miR-155 (Sechsecke). Es wurden zwölf T_H1 ($IFN\gamma^+$, schwarz), neun T_H17 ($IL-17^+$, blau) und fünf $T_H17/1$ ($IFN\gamma^+IL-17^+$, grün) Klone analysiert. Die horizontale Linie stellt den Median dar. Die Ct-Werte wurden auf das *housekeeping* Gen RNU48 ($2^{\Delta C_t}$ RNU48) und anschließend auf die unstimulierte Kontrolle ($2^{\Delta\Delta C_t}$ os) relativiert. Unterschiede wurden mittels des nicht parametrischen Mann-Whitney U-Tests auf Signifikanzen untersucht. Die Sterne im unteren Bereich der Graphik stellen die Signifikanzen für den Vergleich zwischen T-Zellklonen vor und nach Restimulation mit PMA/Ionomycin dar. Der Pfeil steht für Hochregulation (↑) oder Herunterregulation (↓) nach Stimulation. Berechnung der Signifikanzen mit Hilfe des nicht-parametrischen Wilcoxon signed rank Tests. Die gepunktete Linie zeigt den Wert (1), bei dem keine Änderung der miRNA Expression nach Stimulation auftrat. Signifikanzen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Tendenz: $p < 0,1$. T_H = T-Helfer, miR = microRNA, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat.

Beim Vergleich zwischen unstimulierten und PMA/Ionomycin stimulierten T_H1 , T_H17 und $T_H17/1$ Klonen (Signifikanzen im unteren Bereich der Abbildung 4.1.6) konnte für miR-26a die Tendenz ($p = 0,0674$) einer verminderten Expression nach Restimulation in T_H1 Klonen detektiert werden. Für miR-29a und miR-142-3p konnte eine signifikant ($p = 0,0039$) bzw. tendenziell ($p = 0,0547$) gesteigerte Expression nach Restimulation in T_H17 Klonen nachgewiesen werden. Sowohl in T_H1 , als auch in T_H17 Klonen stieg die Expression von miR-155 nach Restimulation signifikant an ($p = 0,042$, $p = 0,0078$). Die Analysen zur Expression der Kandidaten-miRNAs und miR-155 nach Restimulation unter Relativierung auf die unstimulierte Kontrolle haben gezeigt, dass miR-29a nach Restimulation in T_H17 Klonen ($p = 0,0122$) deutlich stärker hoch reguliert wurden im Vergleich zu T_H1 Klonen (Abbildung 4.1.6). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es nach Restimulation tendenziell zu einer stärkeren Hochregulation von miR-142-3p in T_H17 Klonen verglichen mit $T_H17/1$ Klonen kommt (Abbildung 4.1.6). Insgesamt war die Streuung der Daten jedoch sehr hoch, so dass weitere Unterschiede bezüglich der miRNA Expression in T-Zellklonen nach Restimulation nicht ausgeschlossen werden können.

4.2 Identifizierung potentieller Zielgene und Modulation der miRNA-Expression

4.2.1 Identifizierung potentieller Zielgene der Kandidaten-miRNAs

MiRNAs regulieren die Expression von Genen durch Inhibition der Translation oder Degradation der mRNA. Um die Funktion der identifizierten miRNA-Kandidaten näher zu charakterisieren wurde eine Zielgenanalyse auf Basis von Sequenzübereinstimmungen vorgenommen. Dazu wurde für jede Kandidaten-miRNA über die miR-Gen Plattform (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi>) eine Zielgenvorhersage durchgeführt. Die Zielgene wurden anschließend bezüglich der Expression in immunologischen Geweben analysiert (Details s. Material und Methoden).

Tabelle 4.2: Anzahl und Zuordnung von Zielgenen für die Kandidaten-miRNAs. Für die Kandidaten miRNAs miR-21, miR-26a, miR-29a und miR-142-3p wurden mit Hilfe der miR-Gen Plattform auf Basis von Sequenzübereinstimmungen mögliche Zielgene identifiziert. Anschließend wurden diese bezüglich der Expression in lymphoiden Organen (Blut, Lymphe, Lymphknoten, Milz, Thymus) untersucht und bestimmt wieviele dieser Gene bereits validiert waren. miR = microRNA.

	Anzahl Zielgene positiv für mind. 2 Algorithmen	Anzahl Zielgene exprimiert in mind. 2 lymphoiden Organen *	*Anzahl der davon validierten Zielgene (Gesamtzahl validierter Zielgene)
miR-21	202	144	55 (581)
miR-26a	516	410	15 (30)
miR-29a	581	404	8 (44)
miR-142-3p	288	223	11 (109)

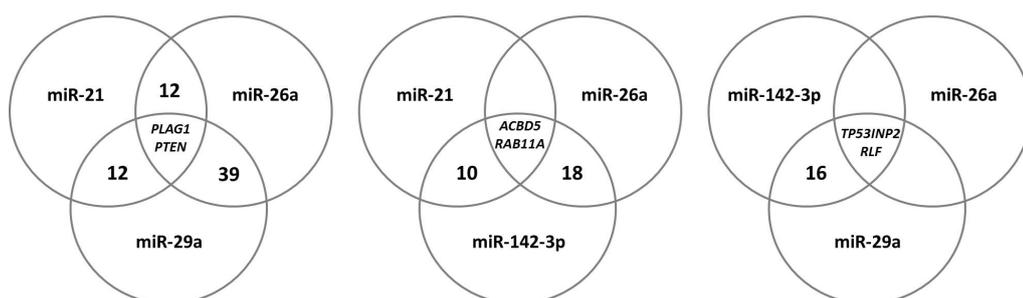


Abbildung 4.2.1: Überlapp der Zielgene zwischen den Kandidaten-miRNAs. Zielgene der miRNA-Kandidaten (miR-21, miR26a, miR-29a, miR-142-3p), welche in mindestens zwei lymphoiden Organen exprimiert sind, wurden zwischen den einzelnen miRNA-Kandidaten verglichen. In den Schnittmengen ist die Anzahl oder die Bezeichnung der von mehreren miRNAs als Zielgen vorhergesagten Gene dargestellt. miR = microRNA, PLAG1 = *pleomorphic adenomagen 1*, PTEN = *phosphatase and tensin homolog*, ACBD5 = *acyl-CoA binding domain containing 5*, RAB11A = *Ras-related in brain protein 11A*, TP53INP2 = *tumor protein p53 inducible nuclear protein 2*, RLF = *relaxin-like factor*.

Die Anzahl der durch die miR-Gen Plattform vorhergesagten Zielgene lag für miR-21 bei 202

Zielgenen, für miR-26a bei 516 Zielgenen, für miR-29a bei 581 Zielgenen und für miR-142-3p bei 288 Zielgenen (Tabelle 4.2.1, erste Spalte). Analysen bezüglich der Expression vorhergesagter Zielgene in mindestens zwei lymphoiden Organen (Blut, Lymphe, Lymphknoten, Milz, Thymus) ergaben 144 für miR-21, 410 für miR-26a, 404 für miR-29a und 223 für miR-142-3p (Tabelle 4.2.1, zweite Spalte).

Es konnten 107 Zielgene identifiziert werden, die für zwei Kandidaten-miRNAs vorhergesagt wurden (miR-21/miR-26a = 12, miR-21/miR-29a = 12, miR-21/miR-142-3p = 10, miR-26a/miR-29a = 39, miR-26a/miR-142-3p = 18, miR-29a/miR-142-3p = 16) (Abbildung 4.2.1). Sechs Zielgene wurden von drei Kandidaten-miRNAs als Zielgen vorhergesagt. Für miR-21, miR-26a und miR-29a wurde *Pleomorphic adenomogene 1* (PLAG 1) und *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) identifiziert. Für miR-21, miR-26a und miR-142-3p konnten *acyl-CoA binding domain containing 5* (ACBD5) und *Ras-related in brain protein 11A* (RAB11A) als Zielgene identifiziert werden und für miR-26a, miR-29a und miR-142-3p wurde *relaxin-like factor* (RLF) als Zielgen vorhergesagt.

Die vorhergesagten Zielgene wurden mittels der DAVID-Plattform (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) funktionell klassifiziert. Hierbei wurden mehrere immunologisch relevante Signalwege identifiziert: Apoptose, B-Zellrezeptor Signalweg, Calcium Signalweg, Chemokin Signalweg, Fc γ R-vermittelte Phagozytose, NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität, T-Zellrezeptor Signalweg, *Toll-like* Rezeptor Signalweg und der VEGF Signalweg. Die bei der funktionellen Klassifizierung resultierenden Signalwege waren jedoch bei Erhöhung der Stringenz nicht mehr signifikant. Die Aussagekraft dieser Zuordnung ist damit begrenzt. Ein Teil der in lymphoiden Organen exprimierten Zielgene sind bereits validiert. Die Anzahl der validierten Zielgene unterschied sich stark zwischen den einzelnen Kandidaten-miRNAs. Für miR-21 sind 55 Zielgene validiert, für miR-26a 15 Zielgene, für miR-29a 8 Zielgene und für miR-142-3p sind 11 Zielgene bereits validiert (Tabelle 4.2.1, dritte Spalte).

Durch die Analyse potentieller Zielgene konnten Moleküle identifiziert werden, auf deren Basis die Funktion der miRNAs möglicherweise näher aufgeklärt werden kann.

Korrelation der Expression der Kandidaten-miRNAs

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass die Regulation der Kandidaten-miRNAs auf gleichen oder ähnlichen Wegen erfolgt. Ein Hinweis wäre hierfür wären vergleichbare Expressionslevel der Kandidaten-miRNAs. Diese sollten an einer Korrelation der Expression zwischen den Kandidaten-miRNAs zu erkennen sein. Daher wurde die Korrelation der Expression der Kandidaten-miRNAs in CD4⁺ T-Zellen in Deutschland rekrutierter Probanden analysiert.

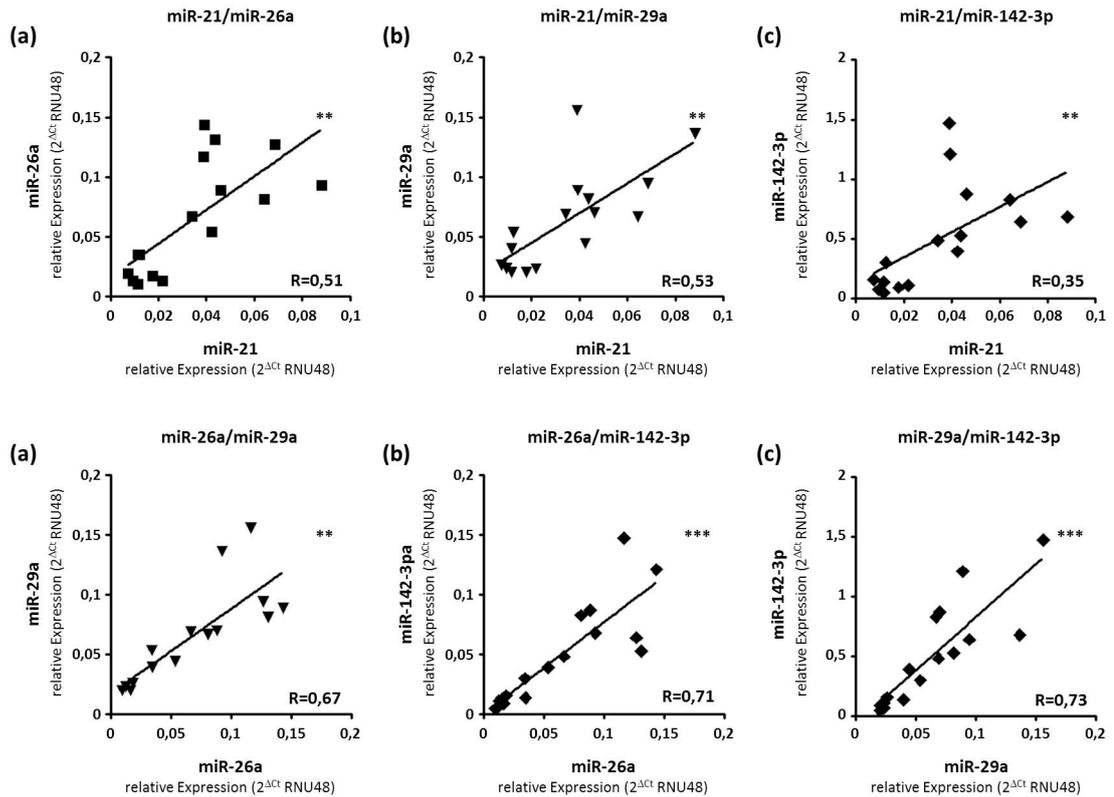


Abbildung 4.2.2: Korrelation der Expression der Kandidaten-miRNAs. Für die Kandidaten-miRNAs wurde die Korrelation der Expression in CD4⁺ T-Zellen von 16 Spendern analysiert (6 × TB, 7 × LTBI, 3 × nicht *M. tuberculosis*-infizierte Kontrollen). Dargestellt ist die lineare Regression für die Korrelation der relative Expression von (a) miR-21 mit miR-26a und miR-29a (b) miR-21 mit miR-142-3p (c) miR-26a mit miR-29a und miR-142-3p (d) miR-29a mit miR-142-3p. Die Ct-Werte wurden auf das *housekeeping* Gen RNU48 ($2^{\Delta Ct}$ RNU48) relativiert. Jedes Symbol stellt einen einzelnen Spender dar. Die Korrelation wurde mit Hilfe des nicht-parametrischen Spearman Tests auf Signifikanzen untersucht. Signifikanzen: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; miR = microRNA.

Die Expression von miR-21 in CD4⁺ T-Zellen korreliert signifikant mit der Expression der anderen drei Kandidaten-miRNAs (miR-26a: $p = 0,0012$, miR-29a: $p = 0,0015$, miR-142-3p: $p = 0,0013$). Ebenfalls korreliert die Expression von miR-26a mit miR-29a und miR-142-3p (miR-29a: $p < 0,0001$, miR-142-3p: $p < 0,0001$) und von miR-29a mit miR-142-3p ($p < 0,0001$).

Diese Ergebnisse legen gemeinsame Prozesse der Induktion der identifizierten Kandidaten-miRNAs nahe.

4.2.2 Initiale Etablierung der stabilen Überexpression von miR-29a mittels eines lentiviralen Systems

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Expression der Kandidaten-miRNAs in verschiedenen Kontexten (T-Zelldifferenzierung 4.1.2 und 4.1.5, T-Zellaktivierung 4.1.3 und 4.1.6) be-

schrieben. Im Folgenden sollte durch Modulation der Kandidaten-miRNA Expression der funktionelle Einfluss der miRNAs näher untersucht werden. Hierfür wurde ein lentivirales System etabliert, welches es ermöglicht potentielle Zielgene nach exogener Expression der miRNAs auf Proteinebene zu analysieren.

Die lentivirale Transduktion ermöglicht die Modulation der Genexpression in primären Zellen mit minimalen Nebeneffekten auf die Zielzellen. Verglichen mit anderen Methoden wie Elektroporation oder Lipid-basierter Transfektion, ermöglicht die lentivirale Transduktion eine deutlich höhere Effektivität.

In den folgenden Experimenten werden zur initialen Etablierung des lentiviralen Systems zunächst *Human Embryonal Kidney* (HEK) 293T Zellen mit verschiedenen, für die humane miR-29a kodierenden lentiviralen Vektoren (LeGO) transduziert. MiR-29 wurde ausgewählt, da $IFN\gamma$ als Zielgene beschrieben ist [1]. $IFN\gamma$ ist mittels Durchflusszytometrie einfach nachweisbar.

Transduktion von HEK293T Zellen mit miR-29a (LeGO-iG2-Vektor)

Um eine exogene Expression von miR-29a zu erreichen, wurde das humane miR-29a Gen mit Hilfe spezifischer Restriktionsschnittstellen in den lentiviralen Expressionsvektor LeGO-iG2 kloniert (Details s. Material und Methoden). Der LeGO-iG2 Vektor kodiert zusätzlich für eGFP, welches über eine *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) an das Zielgen gekoppelt ist. Es wurden HEK-293T Zellen mit transgenen Viren infiziert (Details s. Material und Methoden). Anschließend wurde mittels qPCR die miR-29a Expression und mittels Durchflusszytometrie die eGFP Expression in den HEK293T Zellen bestimmt. In eGFP positiven HEK293T Zellen, sollte bei einem funktionsfähigen Vektor miR-29a auf RNA-Ebene nachweisbar sein.

Am dritten Tag nach Transduktion ergab sich in dem gezeigten, repräsentativen Experiment eine Transduktionseffizienz von 64,9 % für den Kontrollvektor und 18,7 % für den miR-29a Vektor (Abbildung 4.2.2 (a)). Eine höhere Transduktionseffizienz für den Kontrollvektor war zu erwarten, allerdings konnte in den miR-29a transduzierten Zellen keine hoch eGFP⁺ Zellpopulation detektiert werden (Abbildung 4.2.2 (a)). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der miR-29a transduzierten Zellen (eGFP⁺, MFI = 1500) lag deutlich niedriger, als die des Kontrollvektors (MFI \approx 230.000) (Abbildung 4.2.2 (b)). Der quantitative Nachweis von miR-29a auf RNA-Ebene zeigte einen 1,6-fachen Anstieg der Expression von miR-29a in LeGO-iG2_miR-29a transduzierten HEK293T-Zellen (Abbildung 4.2.2 (c)) verglichen mit dem Kontrollvektor. Die Überexpression von miR-29a wurde allerdings nicht in aufgereinigten eGFP⁺ HEK293T Zellen bestimmt, so dass dieses Ergebnis die Überexpression auf Einzelzellebene vermutlich unterschätzt. Der LeGO-iG2 Vektor erwies sich damit als suboptimal für die exogene Expression von miR-29a. Im iG2-Vektor ist das Zielgen über eine IRES an das eGFP gekoppelt. Es könnte sein,

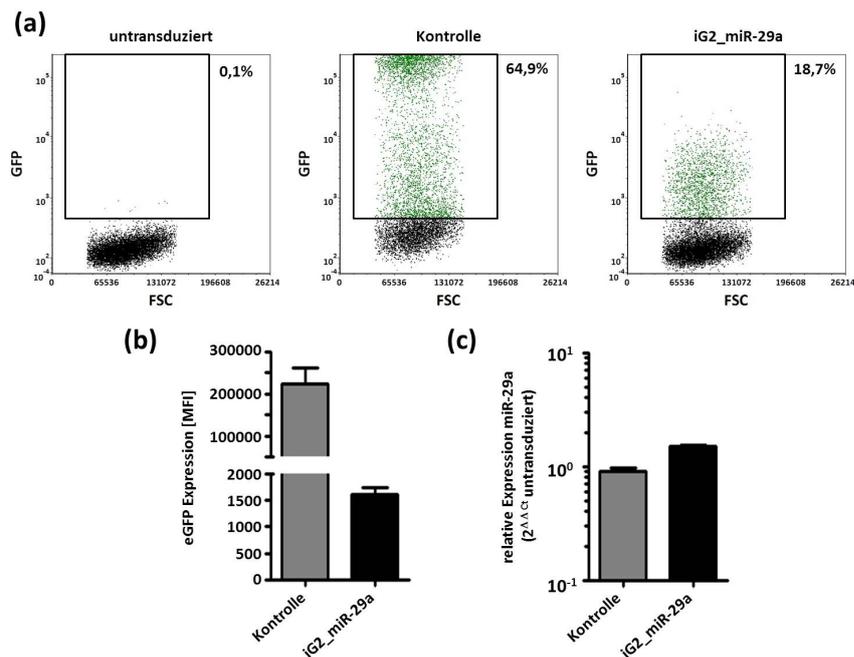


Abbildung 4.2.3: Transduktion von HEK293T Zellen mit LeGO-iG2_miR-29a. HEK293T Zellen wurden mit 100 μ L Virusüberstand des Kontrollvektors (LeGO-G2) und des miR-29a Vektors (LeGO-iG2_miR-29a) infiziert, sowie nicht-infiziert (untransduziert) belassen. Nach drei Tagen wurde die Transduktionseffizienz und die Expression von miR-29a analysiert. **(a)** Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrische Analyse der HEK293T Zellen. Der Anteil eGFP⁺ (grün) Zellen zeigt die Effizienz der Transduktion für ein repräsentatives von zwei Experimenten. Dargestellt sind die viablen Zelle (SSC/FSC). **(b)** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der eGFP⁺ Zellen der LeGO-G2, LeGO-iG2_miR-29a Zellen. Dargestellt ist der Median mit Standardfehler aus zwei Experimenten **(c)** Relative Expression von miR-29a in den Zellen der Kontroll- und miR-29a Transduktion. Dargestellt ist der Median mit Umfangsbereich für eine Doppelbestimmung. Die Werte wurden auf das *housekeeping Gen* RNU48 und anschließend auf die untransduzierte Kontrolle relativiert ($2^{\Delta\Delta C_t}$ untransduziert). miR = microRNA, Ct = cycle threshold.

dass durch die Prozessierung der miRNA die Expression des eGFP behindert wird. Deshalb wurde als nächstes die humane miR-29a Sequenz in einen LeGO-Vektor ohne IRES kloniert.

Transduktion von HEK292T Zellen mit miR-29a (LeGO-G-Vektor)

Der lentivirale LeGO-G Expressionsvektor ist so aufgebaut, dass Zielgen und eGFP unter zwei verschiedenen Promotoren exprimiert werden (Details s. Material und Methoden). Dies bietet den Vorteil, dass die Prozessierung der miR-29a keinen Einfluss auf die Translation des eGFP hat, allerdings ist damit die Expression von eGFP nicht mehr an die Expression von miR-29a gekoppelt.

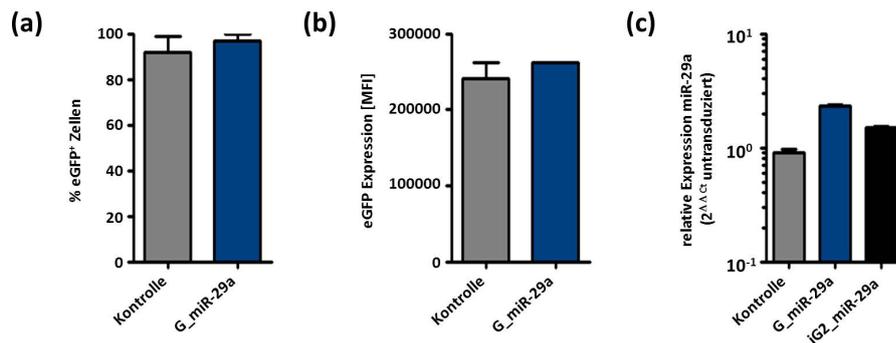


Abbildung 4.2.4: Transduktion von HEK293T Zellen mit LeGO-G_miR-29a. HEK293T Zellen wurden mit 50 μ L Virusüberstand des Kontrollvektors (LeGO-G2) und des miR-29a Vektors (LeGO-G_miR-29a) infiziert, sowie nicht-infiziert (untransduziert) belassen. Nach drei Tagen wurde die Transduktionseffizienz und die Expression von miR-29a analysiert. **(a)** Transduktionseffizienz des Kontroll- und miR-29a Vektors. Dargestellt ist der Median mit Standardfehler aus zwei Experimenten. **(b)** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der eGFP⁺ Zellen der LeGO-G2 und LeGO-G_miR-29a transduzierten Zellen. Dargestellt ist der Median mit Standardfehler aus zwei Experimenten. **(c)** Relative Expression von miR-29a in den Zellen der Kontroll-, LeGO-G_miR-29a und LeGO-iG2_miR-29a Transduktion. Dargestellt ist der Median mit Standardfehler für eine Doppelbestimmung. Die Werte wurde auf das *housekeeping Gen* RNU48 und anschließend auf die untransduzierte Kontrolle relativiert ($2^{\Delta\Delta C_t}$ untransduziert). miR = microRNA, Ct = cycle threshold.

Die Umklonierung der humanen miR-29a Sequenz in den LeGO-G Vektor ermöglichte eine hohe Transduktionseffizienz in den HEK293T Zellen. Bereits mit 50 μ L Virusüberstand konnten 93,4 % der Zellen mit miR-29a transduziert werden (Kontrollvektor 84,2 %) (4.2.4 (a)). Die MFI der transduzierten Zellen war ebenfalls deutlich höher im Vergleich zum vorher verwandten IRES-Vektor (LeGO-iG2_miR-29a). Diese lag sowohl für den Kontrollvektor, als auch für den miR-29a Vektor bei ca. 250.000 (Abbildung 4.2.4 (b)). Die quantitative Analyse der miR-29a Expression zeigte allerdings nur einen 1,6-fachen Anstieg der miR-29a Expression in den mit LeGO-G_miR-29a transduzierten Zellen verglichen mit dem zuvor genutzten IRES-Vektor (4.2.4 (c)).

Ursächlich dafür könnte sein, dass der LeGO-G Vektor einen murinen U6-Promotor zur Expression des humanen Zielgens besitzt. Möglicherweise wird dadurch die Expressionseffizienz beeinträchtigt. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt der im Mausmodell verwandte U6-Promotor des Zielgens in LeGO-G gegen einen humanen Promotor ausgetauscht.

Transduktion von HEK293T Zellen mit miR-29a (LeGO-G_H1-Vektor)

Der Austausch des U6-Promotors im LeGO-G Vektor gegen den humanen H1-Promtor (Details s. 3.9) wurde gewählt, da der H1-Promotor als funktionsfähig in Säugerzellen für die Expression von siRNAs beschrieben ist [145].

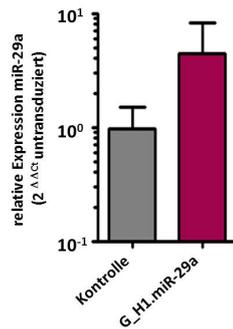


Abbildung 4.2.5: Transduktion von HEK293T Zellen mit LeGO-G_H1.miR-29a. HEK293T Zellen wurden mit 5 μ L Virusüberstand des Kontrollvektors (LeGO-G2) und des miR-29a Vektors (LeGO-G_H1.miR-29a) infiziert, sowie nicht-infiziert (untransduziert) belassen. Nach drei Tagen wurde die Expression von miR-29a analysiert. Dargestellt ist der Median mit Standardfehler für die relative Expression von miR-29a in den Zellen der Kontroll- und miR-29a Transduktion. Die Werte wurden auf das *housekeeping Gen* RNU48 und anschließend auf die untransduzierte Kontrolle relativiert ($2^{\Delta\Delta C_t}$ untransduziert). miR = microRNA, Ct = cycle threshold.

Durch den Austausch des im Mausmodell verwandten U6-Promotors gegen den humanen H1-Promotor wurde eine mit dem zuvor genutzten Vektor LeGO-G_miR-29a vergleichbare Transduktionseffizienz und MFI der transduzierten Zellen erreicht (Daten nicht gezeigt). Der quantitative Nachweis der miR-29a Expression via qPCR zeigte eine 5,7-fach erhöhte Expression der miR-29a RNA in Zellen transduziert mit LeGO-G_H1.miR-29a, verglichen mit dem Kontrollvektor. Allerdings zeigte die Analyse hohe Schwankungen (Abbildung 4.2.5).

Tabelle 4.3: Tabellarische Zusammenfassung der exogenen Expression von miR-29a mit LeGO-Vektoren in HEK293T Zellen.

Vektor	Transduktions-effizienz [%]	Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)	x-fache Steigerung der miR-29a Expression im Vergleich zur Kontrolle
LeGO-iG2	18,7	1500	+ 1,6 x
LeGO-G_U6	93,4	~ 250.000	+ 2,6 x
LeGO-G_H1	75,3	~ 250.000	+ 5,7 x

Transduktion von primären, humanen CD4⁺ T-Zellen mit miR-29a (LeGO-G_H1-Vektor)

Im nächsten Schritt wurden humane CD4⁺ T-Zellen mit LeGO-G_H1.miR-29a transduziert.

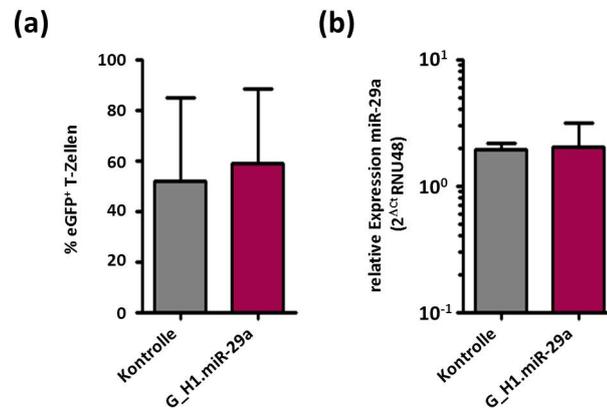


Abbildung 4.2.6: Transduktion von humanen CD4⁺ T-Zellen mit LeGO-G_H1.miR-29a. Primäre CD4⁺ T-Zellen wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 10 mit dem Virusüberstand des Kontrollvektors (LeGO-G2) und des miR-29a Vektors (LeGO-G_H1.miR-29a) infiziert, sowie nicht-infiziert (untransduziert) belassen. Nach zwei Tagen wurde die Transduktionseffizienz und die Expression von miR-29a analysiert. **(a)** Prozentualer Anteil der eGFP⁺ T-Zellen (Transduktionseffizienz) aus zwei Experimenten. Dargestellt ist der Median mit Standardfehler. **(b)** Relative Expression von miR-29a in den Zellen der Kontroll- und miR-29a Transduktion. Dargestellt ist der Median mit Standardfehler für zwei Experimente. Die Werte wurde auf das *housekeeping Gen* RNU48 relativiert (2^{-ΔCt} RNU48). miR = microRNA, Ct = cycle threshold.

Die Transduktionseffizienzen des Kontrollvektors und des miR-29a Vektors waren mit 51,83 % bzw. 59,08 % GFP⁺Zellen vergleichbar. Allerdings waren die Schwankungen zwischen den zwei durchgeführten Transduktion hoch (Abbildung 4.2.6 (a)). Die MFI der T-Zellen war zwischen dem Kontrollvektor und dem miR-29a Vektor vergleichbar, lag aber deutlich unterhalb der MFI der HEK293T Zelltransduktion (Daten nicht gezeigt). Der quantitative Nachweis von miR-29a ergab allerdings keine gesteigerte miR-29a Expression in den mit LeGO-G_H1-miR-29a transduzierten T-Zellen verglichen mit dem Kontrollvektor. Zusammenfassend wurde damit durch den Austausch des im Mausmodell verwandten U6-Promotors gegen den humanen H1-Promotor keine exogene Expression von miR-29a in primären, humanen CD4⁺ T-Zellen induziert werden.

Im Folgenden wurde daher die Expression des Vorläuferkonstruktes (pre-miR-29a) der reifen miR-29a mittels qPCR analysiert. Dabei sollte analysiert werden, ob der Prozessierungsschritt möglicherweise beeinträchtigt ist.

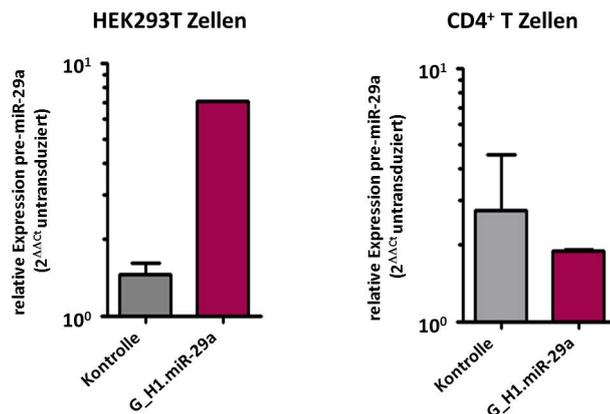


Abbildung 4.2.7: Expression von pre-miR-29a in HEK293T und CD4⁺ T-Zellen nach Transduktion mit LeGO-G_H1.miR-29a. Primäre CD4⁺ T-Zellen und HEK293T Zellen wurden mit Virusüberstand des Kontrollvektors (LeGO-G2) und des miR-29a Vektors (LeGO-G_H1.miR-29a) infiziert, sowie nicht-infiziert (untransduziert) belassen. Dargestellt ist der Median mit Standardfehler für die relative Expression von pre-miR-29a (Doppelbestimmung). Die Werte wurde auf das *housekeeping Gen* β -Actin und anschließend auf die untransduzierte Kontrolle relativiert ($2^{\Delta\Delta C_t}$ untransduziert) relativiert. miR = microRNA, Ct = cycle threshold.

Für HEK-293T Zellen konnte nach Transduktion mit dem LeGO-G_H1.miR-29a Vektor eine 4,8-fache Steigerung der pre-miR-29a Expression im Vergleich zum Kontrollvektor detektiert werden (Abbildung 4.2.7 links). Im Gegensatz dazu war die Expression der pre-miR-29a in LeGO-G_H1.miR-29a und in mit dem Kontrollvektor transduzierten T-Zellen vergleichbar (Abbildung 4.2.7 rechts). Die basale Expression von pre-miR-29a in HEK293T Zellen transduziert mit dem Kontrollvektor war 1,6 - fach niedriger als in den Kontrollvektor transduzierten T-Zellen.

Weitere Experimente zur Überexpression von miR-29a in HEK293T Zellen bzw. CD4⁺ T-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit eingestellt.

4.2.3 Etablierung der transienten Inhibition von miR-29a

Neben der exogenen Expression von miRNAs durch lentivirale Systeme bieten s.g. Antagomirs eine weitere Möglichkeit der *in vitro* Modulation der miRNA Expression. Dabei wird im Gegensatz zur stabilen lentiviralen Transduktion eine transiente Herunterregulation der Ziel-miRNA durch die Antagomir induziert. Antagomirs sind chemisch modifizierte, einzelsträngige Oligonukleotide, welche komplementär zur Ziel-miRNA sind [151]. Durch die Bindung einer Antagomir an ihre Ziel-miRNA wird diese konstitutiv inhibiert. Anschließend kann der Einfluss der Inhibition auf verschiedene Zellprozesse (z.B. Proliferation, Reifung, Apoptose, etc.) analysiert werden.

Die Anwendung dieser Methode wurde im Folgenden für miR-29a getestet. Durch die durchflusszytometrische Analyse konnte das im Mausmodell als Zielgen für miR-29a identifizierte IFN γ [1] einfach bestimmt werden. Die folgenden Experimente zur Etablierung der Methode

wurden zunächst mit Jurkat Zellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine immortalisierte T-Zelllinie.

Bestimmung der optimalen Menge des Transfektionsreagenzes DharmaFECT 4

Bei DharmaFECT 4 (DF4) handelt es sich um Lipid-basiertes Transfektionsreagenz, dessen Effizienz mit Hilfe von Jurkat Zellen getestet wurde. In vorangegangenen Experimenten zeigte sich eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen/96well als optimal für eine Transduktionseffizienz von um die 30 % bei nahezu 100 %iger Viabilität der Zellen (Daten nicht gezeigt). Somit wurden 1×10^5 Jurkat Zellen mit verschiedenen Mengen (0,05 μ L, 0,1 μ L, 0,25 μ L, 0,5 μ L pro 96well) DF4 und einer Kontroll-Antagomir (cel-miR-67-Dy457) transfiziert (Details s. Material und Methoden). Die Kontroll-Antagomir ist an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, so dass anschließend die Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden konnte.

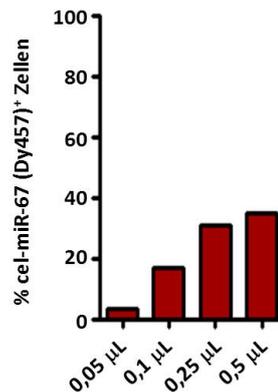


Abbildung 4.2.8: Transduktionseffizienz in Abhängigkeit der DharmaFect 4 Menge. Jurkat Zellen (1×10^5 Zellen/96well) wurden mit verschiedenen Mengen DharmaFECT 4 (DF4) und der Kontroll-Antagomir cel-miR-67-Dy547 (25 nM) transfiziert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Transfektionseffizienz der lebenden Zellen bestimmt. Dargestellt ist die Transduktionseffizienz der Kontroll-Antagomir beim Einsatz verschiedener Mengen DF4 (0,05 μ L; 0,1 μ L; 0,25 μ L; 0,5 μ L pro 96well) für ein Experiment. Der Anteil Dy457⁺ Zellen zeigt die Effizienz der Transfektion. miR = microRNA.

Die Transfektionseffizienz zeigte deutliche Abhängigkeit von der Menge DF4. Mit 0,05 μ L DF4 konnten nur 3,3 % der viablen Zellen transfiziert werden, was über 0,1 μ L (16,8 %) und 0,25 μ L (30,6 %) auf 34,6 % mit 0,5 μ L DF4 gesteigert werden konnte (Abbildung 4.2.8). Somit wurde für die folgenden Experimente 0,5 μ L DF4 für die Antagomir-Transfektion verwandt.

Bestimmung der optimalen Antagomir-Konzentration

Als nächstes wurde bestimmt, ob unterschiedliche Konzentrationen der Antagomir einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz haben. Jurkat Zellen wurden daher mit verschiedenen Kon-

zentrationen (25 nM, 35 nM, 45 nM, 50 nM) der Kontroll-Antagomir (cel-miR-67-Dy457) transfiziert. Anschließend wurde die Transfektionseffizienz via Durchflusszytometrie bestimmt.

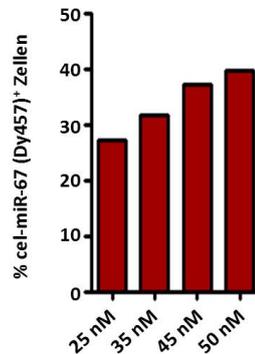


Abbildung 4.2.9: Transduktionseffizienz in Abhängigkeit der Antagomir Konzentration. Jurkat Zellen (1×10^5 Zellen/96well) wurden mit verschiedenen Konzentrationen Kontroll-Anatgomir cel-miR-67-Dy547 (25 nM, 34 nM, 45 nM, 50 nM) und 0,5 μ L DharmaFECT 4 transfiziert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Transfektionseffizienz der lebenden Zellen bestimmt. Dargestellt ist die Transduktionseffizienz der Kontroll-Antagomir unter Verwendung verschiedener Konzentrationen (25 nM, 34 nM, 45 nM, 50 nM) für ein Experiment. Der Anteil Dy457⁺ Zellen zeigt die Effizienz der Transfektion. miR = microRNA.

Die Konzentration der Kontroll-Antagomir hatte keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Bei allen vier verwandten Konzentrationen lag der prozentuale Anteil der lebenden Zellen bei > 97 % (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnte mit steigender Konzentration der Kontroll-Antagomir der prozentuale Anteil transduzierter Zellen gesteigert werden. Mit 27,1 % lag die Transfektionseffizienz bei einer Antagomir-Konzentration von 25 nM im erwarteten Bereich (Abbildung 4.2.9 (b), zum Vergleich 4.2.8). Bei einer Konzentration von 35 nM und 45 nM wurde eine Transfektionseffizienz von 31,6 % bzw. 37,2 % erreicht und mit einer 50 nM Konzentration konnten 39,8 % der Zellen transfiziert werden.

Zusammenfassend ergab sich aus den Experimenten an Jurkat Zellen, dass eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen mit 0,5 μ L DF 4 und einer Antagomir-Konzentration von 50 nM pro 96well optimal für die Transfektion dieser Zellen war.

Initiale Transfektion von T-Zellen mit Antagomir-29a

Nachdem die optimalen Transfektionsbedingungen analysiert waren, wurden die eigentlichen Zielzellen transfiziert. Für die Transfektion von T-Zellen wurde neben der Ziel-Anatagomir (Antagomir-29a) als Positivkontrolle Antagomir-16 und als Negativkontrolle Antagomir-cel-miR-67 (*C. elegans*) eingesetzt (Details s. 3.10). Nach der Transfektion wurde mittels qPCR die Expression von miR-29a, sowie miR-16 analysiert. Weiterhin wurden die Zellen unspezifisch stimuliert und mittels Durchflusszytometrie die Expression von IFN γ bestimmt.

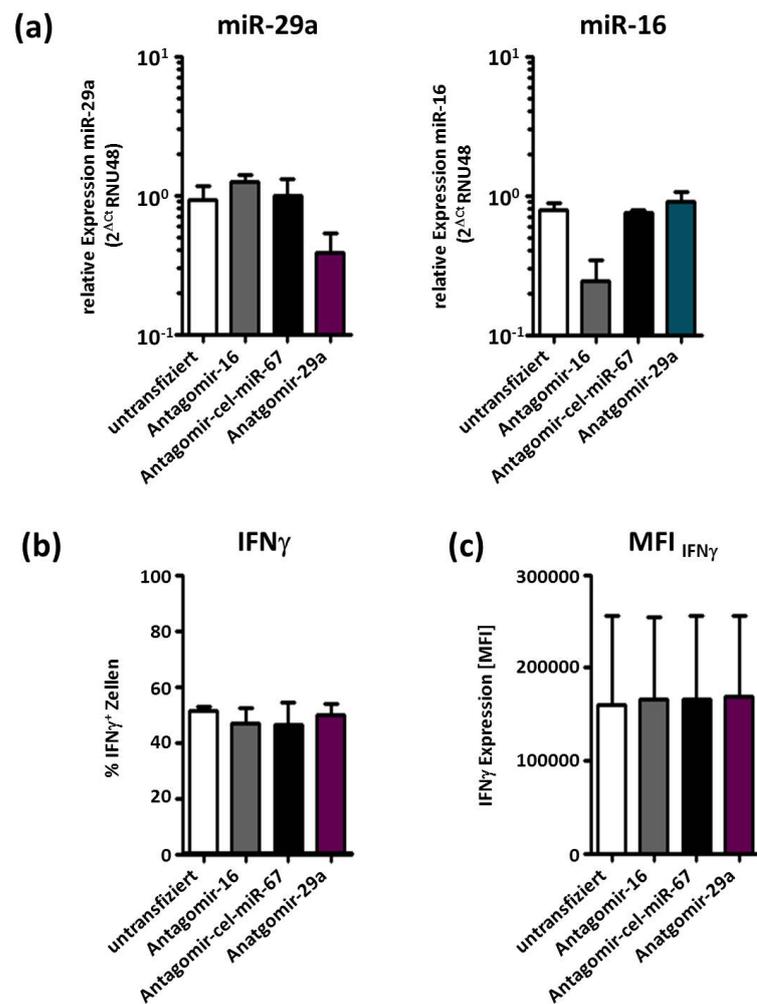


Abbildung 4.2.10: Transfektion von T-Zellen mit Antagomir-29a. T-Zellen wurden mit Antagomir-16 (Positivkontrolle), Antagomir-cel-miR-67 (Negativkontrolle) und Antagomir-29a transfiziert, sowie untransfiziert belassen. **(a)** Relative Expression von miR-29a (links) bzw. miR-16 (rechts) in den transfizierten Zellen. Dargestellt ist der Median mit Standardfehler aus zwei Experimenten. Die Werte wurden auf das *housekeeping* Gen RNU48 relativiert ($2^{\Delta Ct}$ RNU48). **(b)** Prozentualer Anteil IFN γ positiver CD4 $^+$ T-Zellen. Dargestellt ist der Median mit Standardfehler aus zwei Experimenten. **(c)** Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der IFN γ positiven Zellen. Dargestellt ist der Median mit Standardfehler aus zwei Experimenten. miR = microRNA.

Die Analyse der T-Zellen nach Transfektion zeigte für die Kontrollen ein vergleichbares Expressionslevel für miR-29a ($2^{\Delta Ct} = 0,92$, $2^{\Delta Ct} = 1,24$ bzw. $2^{\Delta Ct} = 1,00$). Die mit Antagomir-29a behandelten Zellen dagegen wiesen eine ca. ein Drittel geringere Expression von miR-29a auf (Abbildung 4.2.10 (a) links). Für die Positivkontrolle (Antagomir-16) konnte eine spezifische Inhibition (ca. ein Drittel) der Expression von miR-16 gezeigt werden (Abbildung 4.2.10 (a) rechts). Somit konnte eine Herunterregulation von miR-29a in T-Zellen nach Transfektion mit der Antagomir-29a gezeigt werden. Die transfizierten T-Zellen wurden parallel mittels Durchflusszytometrie bezüglich der Produktion von IFN γ analysiert. Diese zeigte keine veränderte

Expression von IFN γ in Abhängigkeit der transfizierten Antagomir. Um zu überprüfen, ob die T-Zellen auf zellulärer Ebene weniger IFN γ produzierten wurde zusätzlich die MFI bestimmt. Dabei wurde keine Änderung der IFN γ Produktion in Abhängigkeit der transfizierten Antagomir detektiert.

Diese initialen Untersuchungen deuten keine Regulation von IFN γ durch miR-29a im Menschen an.

4.3 MiRNAs als Biomarker für die Erkrankung und Behandlung von Tuberkulose

Aufgrund der niedrigen TB-Fallzahlen in Deutschland ließen initiale Studien keine ausreichenden Untersuchungen zur Veränderung der Kandidaten-miRNA Expression unter Therapie der Erkrankung zu. Daher wurde eine Studie mit einem Spenderkollektiv aus einem Land mit hoher TB-Inzidenz (Ghana) durchgeführt. Dabei sollten die Kandidaten miRNAs neben der potentiellen Funktion als Biomarker der TB-Erkrankung auch im Rahmen einer TB-Therapie untersucht werden. Erwachsene Spender mit einer unbehandelten Tuberkulose (Diagnose: Röntgenaufnahme der Lunge, Sputumtest) und deren Kontakt-Personen (ebenfalls erwachsen) wurden für die Studie rekrutiert. Bei den Kontaktpersonen handelte es sich um Personen, welche in einem Haushalt mit den TB-Erkrankten lebten. Allerdings standen Experimente und Analysen bezüglich einer T-Zellantwort auf Tuberkulose spezifische Antigene noch aus. Es konnte daher bei den Kontaktpersonen nicht definiert werden, ob es sich um LTBI oder nicht-*M. tuberculosis*-infizierte Kontrollen handelte. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten wurde die Expression der Kandidaten-miRNAs quantifiziert. Der erste Zeitpunkt lag vor Therapiebeginn, der zweite Zeitpunkt drei Monate nach Therapiebeginn (während der Therapie) und der dritte Zeitpunkt lag nach Abschluss der Therapie (12 Monate nach Therapiebeginn). Für die Kontaktpersonen wurde nur zum ersten Zeitpunkt die miRNA Expression bestimmt.

4.3.1 Ex vivo Expression der miRNA Kandidaten in CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten und Kontaktpersonen aus Ghana

In einem ghanaischen Spenderkollektiv wurden CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten und deren Kontaktpersonen bezüglich der Expression der vier Kandidaten-miRNAs analysiert. Mittels qPCR wurde die miRNA Expression auf einem *96well* Platten Array bestimmt. Dabei wurden 11 Kontaktpersonen und 13 TB-Patienten analysiert.

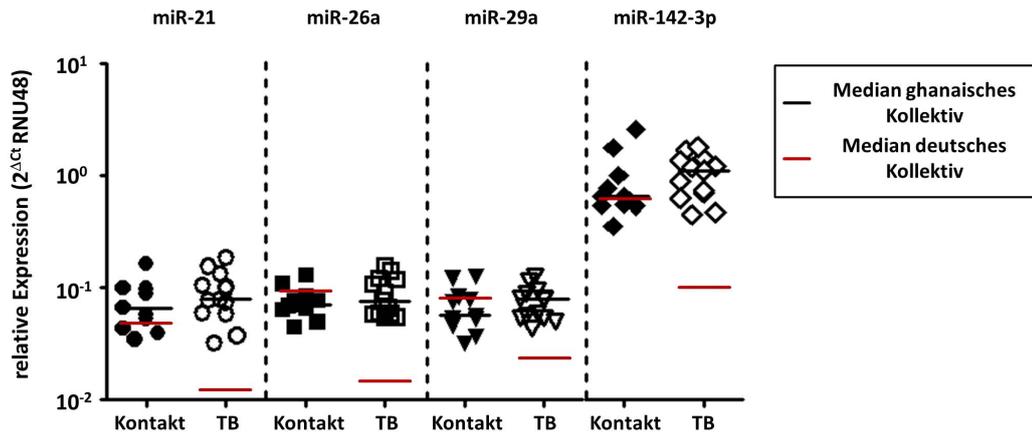


Abbildung 4.3.1: Ex vivo miRNA Expression in CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten und Kontaktpersonen aus Ghana. Analyse der relativen Expression von der Kandidaten-miRNAs in CD4⁺ T-Zellen von Spendern aus Ghana mittels qPCR. Es wurden 11 Kontaktpersonen und 13 TB-Patienten analysiert. Jedes Symbol stellt einen individuellen Spender dar. Die horizontale, schwarze Linie zeigt den Median des ghanaischen Kollektives. Die horizontale, rote Linie zeigt den Median des deutschen Kollektives Die Ct-Werte wurden auf das *housekeeping* Gen RNU48 ($2^{\Delta Ct}$ RNU48) relativiert. TB = Tuberkulose, LTBI = latently *M. tuberculosis* infected, miR = microRNA, Ct = cycle threshold.

Die Expressionsanalyse von 13 TB-Patienten und 11 Kontaktpersonen aus Ghana zeigte keine differentielle Expression für die genannten miRNA-Kandidaten (Abbildung 4.3.1). Das relative Expressionslevel der miRNAs für die Kontaktpersonen aus Ghana lag bezüglich des medianen ΔCt -Wertes (Abbildung 4.3.1 schwarze Linie; miR-21 = 0,067; miR-26a = 0,07; miR-29a = 0,056; miR142-3p = 0,66) in einem vergleichbaren Bereich, wie der Median der ΔCt -Werte der deutschen LTBI (Abbildung 4.3.1 rote Linie; miR-21 = 0,042; miR-26a = 0,09; miR-29a = 0,08; miR142-3p = 0,64). Es konnte jedoch für die ghanaischen TB-Patienten keine verminderte Expression von miR-21, miR-26a, miR-29a und miR-142-3p detektiert werden (Abbildung 4.3.1).

4.3.2 Ex vivo Expression der miRNA Kandidaten in CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten unter Therapie

Als nächstes wurde untersucht, ob eine differentielle Expression der Kandidaten-miRNAs im Verlauf der Therapie vorlag. Dazu wurde die Expression der Kandidaten-miRNAs in einer Kinetik zu drei Zeitpunkten (Zeitpunkt 1: vor Therapiebeginn; Zeitpunkt 2: 3 Monate nach Therapiebeginn; Zeitpunkt 3: 12 Monate nach Therapiebeginn) auf einem *96well* Platten Array analysiert. Dabei konnten 6 TB-Patienten zum ersten und zweiten Zeitpunkt analysiert werden, Für 5 TB-Patienten konnte die Expression der Kandidaten-miRNAs zu allen drei Zeitpunkten untersucht werden.

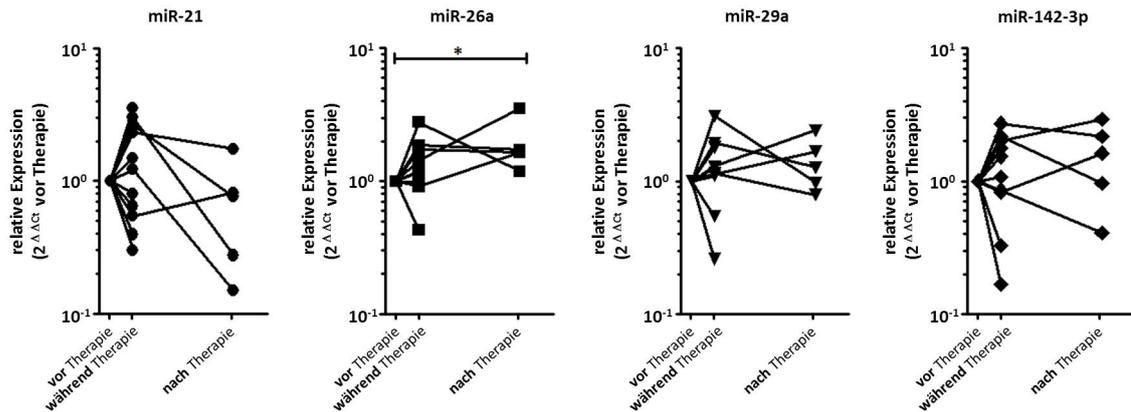


Abbildung 4.3.2: Kinetik der *ex vivo* Expression der Kandidaten-miRNAs in TB-Patienten aus Ghana.

Analyse der Expression der Kandidaten-miRNAs vor ($n = 11$), während (3 Monate nach Therapiebeginn, $n = 11$) und nach (12 Monate nach Therapiebeginn, $n = 5$) Therapie bei TB-Patienten. Mit Hilfe von qPCR auf Platten-Arrays wurde die relative Expression von miR-21 (Kreis), miR-26a (Quadrat), miR-29a (Dreieck) und miR-142-3p (Raute) bestimmt. Jedes Symbol stellt einen individuellen Spender dar. Berechnung der Signifikanzen mit Hilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Tests. Signifikanzen: $*p < 0,05$; Die Ct-Werte wurden auf das *housekeeping* Gen RNU48 und anschließend auf den ersten Zeitpunkt relativiert ($2^{\Delta\Delta C_t}$ vor Therapie). TB = Tuberkulose, miR = microRNA, Ct = cycle threshold.

Die Expressionkinetik zeigte für alle vier untersuchten Kandidaten-miRNAs eine große Streuung der miRNA-Expression (Abbildung 4.3.2). Nur für miR-26a wurde eine signifikant differentielle Expression detektiert werden. Nach Abschluss der Tuberkulose Therapie war die Expression von miR-26a im Vergleich zum Zeitpunkt vor Therapie erhöht ($p = 0,021$) (Abbildung 4.3.2). Für die anderen drei Kandidaten-miRNAs konnte keine differentielle Expression über den Zeitraum der Therapie detektiert werden (Abbildung 4.3.2). Allerdings lässt dies, aufgrund der großen Streuung, nicht die Schlussfolgerung zu, dass es keine Unterschiede gibt. Gerade für miR-21 ist für die einzelnen TB-Patienten ein zum Teil deutliche Herunterregulation nach Abschluss der Therapie zu erkennen (Abbildung 4.3.2), die Gruppengröße ist jedoch zu klein, um eindeutige Ergebnisse zu erhalten.

5 Diskussion

5.1 Differentielle miRNA Expression in TB-Patienten und LTBI

Die Infektion mit *M. tuberculosis* induziert die Aktivierung spezifischer T-Zellen. Die Beteiligung von miRNAs an der T-Zellantwort bei einer Infektion mit *M. tuberculosis* ist bisher nicht hinreichend untersucht. Diese Arbeit bietet erste Hinweise darauf, dass miRNAs eine Rolle bei der T-Zellantwort der humanen Tuberkulose spielen.

Die Expressionsanalyse von 29 verschiedenen miRNAs in CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten und LTBI ergab vier signifikant differentiell exprimierte miRNAs. Eine aktive Tuberkulose geht in dem hier untersuchten Kollektiv mit einer verminderten Expression von miR-21, miR-26a, miR-29a und miR-142-3p verglichen mit einer latenten *M. tuberculosis* Infektion und PPD⁻ Kontrollen einher. Die verminderte Expression der Kandidaten-miRNAs könnte dabei entweder Ursache oder Folge der aktiven *M. tuberculosis* Infektion sein. Zum einen könnte durch das Pathogen die Expression der Kandidaten-miRNAs herunterreguliert worden sein. *M. tuberculosis* induziert möglicherweise in Makrophagen die Sekretion von Effektormolekülen, die die Expression der Kandidaten-miRNAs in den T-Zellen inhibieren. Diese Annahme wird auch durch die miRNA Expressionsanalyse während der TB-Therapie unterstützt (Daten nicht gezeigt). Unter Einnahme von Antibiotika wird *M. tuberculosis* an seiner Vermehrung gehindert und der Anteil *M. tuberculosis*-infizierter Makrophagen geht zurück. Eine Inhibition der miRNA-Expression durch die Mykobakterien würde verringert und die Rückkehr zum miRNA-Expressionsniveau der LTBI ermöglicht. Zum Anderen könnte bei den TB-Patienten aber auch bereits vor der Infektion eine eingeschränkte oder unterdrückte Expression der Kandidaten-miRNAs vorgelegen haben. Möglicherweise wurde erst dadurch der Ausbruch einer aktiven Tuberkulose ermöglicht. Der beschriebene Einfluss von miRNAs auf eine Vielzahl immunologischer Prozesse, immun-vermittelter Krankheiten, sowie Infektionskrankheiten (s. Einleitung) legt eine regulatorische Funktion von miRNAs auch bei einer Infektion mit *M. tuberculosis* nahe. Die Analyse von potentiellen Zielgenen der Kandidaten-miRNAs bietet weitere Hinweise hierzu.

5.1.1 MiR-21

MiR-21 ist eine der wenigen miRNAs, über deren Funktion bereits eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten vorliegen. MiR-21 hat unter anderem eine beschriebene onkogene Funktion. Bei einer Vielzahl von soliden und leukämischen Tumoren liegt eine Beteiligung von miR-21 nahe

[152, 153]. Dabei konnte beispielsweise eine erhöhte Expression von miR-21 in hepatozellulären Karzinomen [154], Brustkrebs [155, 156] und Gebärmutterhalskrebs [157] nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte für miR-21 auch ein Einfluss auf die Prozesse der Immunantwort gezeigt werden. Sheedy et al. konnten zeigen, dass die Stimulation humaner PBMCs durch LPS zu einer gesteigerten miR-21 Expression führt [31]. LPS bindet dabei an den *toll-like receptor 4* (TLR-4), infolge dessen das Adapterprotein MyD88 den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert. MiR-21 inhibiert in der Folge das proinflammatorische Protein PDCD4 [158], welches die Aktivierung von NF- κ B induziert und die Expression von IL-10 inhibiert [159]. IL-10 ist als antiinflammatorisches Zytokin beschrieben, welches das proinflammatorische Zytokin TNF α und das T_H1 polarisierende Zytokin IL-12 inhibiert [160, 161]. Sowohl TNF α , als auch IL-12 sind an der Immunabwehr bei einer Infektion mit *M. tuberculosis* von zentraler Bedeutung. Zusätzlich konnte eine gesteigerte Expression von IL-10 in der Lunge und im Serum von TB-Patienten nachgewiesen werden [162, 163]. Es ist daher denkbar, dass im Rahmen dieser Arbeit gezeigte verminderte Expression von miR-21 in CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten verglichen mit LTBI eine gesteigerte IL-10 Expression zur Folge hat. IL-10 könnte im Folgenden die zur Kontrolle der *M. tuberculosis* Infektion benötigte T_H1-Immunantwort inhibieren. Auch im Zusammenhang mit der T-Zellantwort sind bereits Kenntnisse über eine Beteiligung von miR-21 vorhanden. Es konnte gezeigt, dass miR-21 in Patienten mit Systemischer Lupus Erythematosus hoch reguliert ist und mit dem Krankheitsverlauf korreliert. Hierbei regulierte miR-21 die Expression von PDCD4 [164]. In einem Antigen-induzierten Arthritis Mausmodell zeigten Iliopoulos et al., dass *programmed cell death-1* (PD-1)^{-/-} CD4⁺ T-Zellen eine gesteigerte Expression von miR-21 verglichen mit wildtyp T-Zellen aufwiesen [165]. Die *in vitro* Behandlung Antigen-spezifischer T-Zellen mit Antagomir-21 führte in diesem Modell zu einer supprimierten Proliferation und Zytokinsekretion von (PD-1)^{-/-} T-Zellen. Die Störung des PD-1 Signalweges führt zum Verlust peripherer Toleranz und der Initiierung von Autoimmunität, wobei eine verminderte Expression von miR-21 eine mögliche Ursache ist. In einer Studie an TB-Patienten konnten erhöhte Anteile PD-1⁺ T-Zellen nach *M. tuberculosis*-spezifischer Stimulation nachgewiesen werden [166]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PD-1 durch *M. tuberculosis* induziertes IFN γ reguliert wird und dass die Inhibition von PD-1 in einer gesteigerten *M. tuberculosis*-spezifischen Proliferation resultiert. Aufgrund der Korrelation der Expression von miR-21 und PD-1 [165] und der Bedeutung von PD-1 für die Immunantwort bei einer TB-Infektion [166], stellt miR-21 möglicherweise einen weiteren Regulationsweg für die PD-1 Expression dar. Es ist denkbar, dass die in dieser Arbeit gezeigte verminderte Expression von miR-21 zu einer gesteigerten Expression von PD-1 führt und somit die schützende T-Zellantwort inhibiert. Des Weiteren wurde miR-21 als anti-apoptotischer Faktor beschrieben. Der *knock-down* von miR-21 in humanen Glioblastomzellen führte zur vermehrten Expression von Caspasen und damit zur Apoptose dieser Zellen [167]. Eine verminderte Expression von miR-21 in TB-Patienten sollte also zur Induktion der Apoptose in T-Zellen führen. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Nachweis

eines gesteigerten Anteils apoptotischer und Apoptose-suszeptibler (Fas⁺, FasLigand⁺) CD4⁺ T-Zellen bei Tuberkulose im zentralen Nervensystem [168]. FasLigand (FasL) ist eines für miR-21 im Rahmen dieser Arbeit vorhergesagtes Zielgen. FasL induziert die Bildung der *death-induced silencing complex* (DISC) nach Bindung an seinen Rezeptor Fas. Infolgedessen werden Caspasen aktiviert, welche die Apoptose der Zellen einleiten. Da in dieser Arbeit eine verminderte Expression von miR-21 in CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten detektiert wurde, ist die Folge möglicherweise eine gesteigerte Expression von FasL, was wie oben beschrieben bereits bei einer Infektion mit *M. tuberculosis* gezeigt werden konnte [168].

5.1.2 MiR-26a

MiR-26a ist, ähnlich wie miR-21, in seiner Bedeutung für Tumorerkrankungen beschrieben. In verschiedenen humanen Krebsarten, wie anaplastische Karzinomen [169], Lungenkarzinomen [154] oder Burkitt Lymphomen [170] konnte für miR-26a eine verminderte Expression detektiert werden. Dies deutet auf eine potentielle Tumor-Suppressor Funktion dieser miRNA hin. Weiterhin konnte durch Sander et al. gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen miR-26a und *c-myc* besteht [170]. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass miR-26a die Expression von *c-myc* inhibiert und umgekehrt. Jacobsen et al. konnten eine hoch regulierte Expression von *c-myc* in CD4⁺ T-Zellen während einer aktiven Tuberkulose verglichen mit LTBI nachweisen [171]. Möglicherweise wird die in dieser Arbeit detektierte verminderte Expression von miR-26a während einer aktiven Tuberkulose durch *c-myc* induziert. Kürzlich konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das Gen *Myc* an der metabolischen Reprogrammierung nach der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist [172].

Eines der in dieser Arbeit vorhergesagten Zielgene für miR-26a war die protoonkogene Serin/Threonin Kinase Pim-1. Jacobsen et al. konnten auch für Pim-1 bei einer globalen Expressionsanalyse eine gesteigerte Expression in CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten verglichen mit LTBI zeigen [171]. Für Pim-1 ist beschrieben, dass es durch Zytokine über den JAK/STAT Signalweg induziert werden kann [173]. Bei einer mykobakteriellen Infektion relevante Zytokine, wie IFN γ und IL-2 aktivieren den JAK/STAT Signalweg. Eine Regulation der T-Zellantwort durch miR-26a über Pim-1 bei einer *M. tuberculosis* Infektion ist daher vorstellbar.

5.1.3 MiR-29a

Der miR-29 Gencluster kodiert für miR-29a, miR-29b und miR-29c und ist einer der am meisten untersuchten miRNA-Kluster. Wie für miR-21 und miR-26a konnte auch für miR-29a eine Beteiligung an verschiedenen Krebsarten gezeigt werden. Bei verschiedenen hämatopoetischen Krebsarten wie chronisch lymphatischer Leukämie [174], akuter myeloider Leukämie [175] oder Mantelzelllymphomen konnte eine verminderte Expression von miR-29a gezeigt werden. Auch im Zusammenhang mit T-Zellen und deren Zytokinexpression konnte bereits die Beteili-

gung von miRNAs gezeigt werden. Im Mausmodell konnten Steiner et al. zeigen, dass der Verlust sämtlicher miRNAs und die dadurch induzierte gesteigerte IFN γ Produktion, allein durch die exogene Expression von miR-29a korrigiert werden konnte [1]. Ma et al. zeigten, dass eine Infektion von Mäusen mit intrazellulären Bakterien (*M. bovis*, *L. monocytogenes*) zu einer Herunterregulation von miR-29a in CD4⁺ T-Zellen führt und dass miR-29a dabei direkt die IFN γ Konzentration regulierte [176]. In T-Zellen von TB-Patienten wurde eine gesteigerte Expression von IFN γ gezeigt [177]. Die in dieser Arbeit gezeigte verringerte miR-29a Expression in TB-Patienten verglichen mit LTBI induziert möglicherweise die gesteigerte Sekretion von IFN γ in TB-Patienten. Weiterhin konnte in humanen Zelllinien eine inverse Korrelation der miR-29a Expression mit der Expression des kostimulatorischen Moleküls B7-H3 gezeigt werden [178]. Im humanen System wiederum zeigten Chapoval et al., dass die Bindung von B7-H3 an seinen putativen Rezeptor auf aktivierten T-Zellen die T-Zellaktivierung und die IFN γ Expression begünstigt [179]. Die in dieser Arbeit gezeigte geringere Expression von miR-29a in TB-Patienten induziert somit unter Umständen eine gesteigerte Expression von B7-H3 und trägt dadurch zu einer gesteigerten IFN γ Sekretion bei.

5.1.4 MiR-142-3p

Systematische Analysen der Rolle von miRNAs haben gezeigt, dass miR-142-3p vor allem in hämatopoetischen Zellen exprimiert ist [180]. Weiterführend wurde gezeigt, dass miR-142-3p bei der T-Zellentwicklung involviert ist [180, 181]. Einige Arbeiten legen eine Beteiligung von miR-142-3p bei immun-pathologischen Erkrankungen nahe. So konnte im Serum von Patienten mit Systemischer Sklerose, eine Autoimmunerkrankung der Gefäße, eine gesteigerte miR-142-3p Expression im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden [182]. Bei Systemischer Lupus Erythematoses dagegen zeigte sich eine verminderte Expression von miR-142-3p in CD4⁺ T-Zellen verglichen mit gesunden Kontrollen [183]. Auch in Immunzellen psoriatischer Haut wurde miR-142-3p nachgewiesen [184]. Die verringerte Expression von miR-142-3p in PBMCs von Patienten akuter myeloider Leukämie [185] und die veränderte Expression von miR-142-3p bei der erwachsenen T-Zell-Leukämie [186], unterstützt weiterhin die Annahme der Bedeutung von miR-142-3p für die T-Zellantwort. Huang et al. untersuchten 2009 den Einfluss von miR-142-3p auf CD4⁺ T-Zellen und regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und verifizierten cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als Zielgen. Dabei wurde gezeigt, dass miR-142-3p die Produktion von cAMP in beiden Zellpopulationen reguliert. Dies geschieht über die mRNA der Adenylylcyclase 9. In CD4⁺ T-Zellen wird die cAMP Konzentration durch Inhibition der Adenylylcyclase 9 supprimiert. In T_{reg} inhibiert Foxp3 die Expression von miR-142-3p, wodurch die Produktion von cAMP ansteigt [137]. cAMP ist ein wichtiger *second messenger* bei der zellulären Signaltransduktion und aktiviert die Proteinkinase A. Der Ras/MAPK Signalweg führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. AP-1 wiederum induziert die Expression von IL-2. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinkinase A direkt die anti-CD3 ver-

mittelte MAPK-Aktivierung inhibiert und somit zu einer verminderten T-Zellaktivierung und Expression von IL-2 führt [187]. Eine verminderte Expression von IL-2 ist als ein Anzeichen von "T-Zellerschöpfung" beschrieben (zusammengefasst in [188]). Für Kinder mit einer aktiven Tuberkulose konnte gezeigt werden, dass sich die CD4⁺ T-Zellen in einem Erschöpfungszustand befinden [189]. Es ist daher denkbar, dass durch die verminderte Expression von miR-142-3p in TB-Patienten verglichen mit LTBI, eine höhere zelluläre Konzentration von cAMP in den CD4⁺ T-Zellen vorliegt. Dadurch würde die Proteinkinase A verstärkt aktiviert, was eine Inhibition der T-Zellaktivierung und der IL-2 Expression bedeuten würde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde IL-10 als ein Zielgen für miR-142-3p hervorgesagt. Ding et al. zeigten kürzlich eine inverse Korrelation der Expression von miR-142-3p mit der Expression von IL-10 in CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender [183]. Wie bereits erwähnt, führt IL-10 durch die Blockade proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und dem T_H1 polarisierenden Zytokin IL-12, zu einer Inhibition der protektiven Immunantwort gegen Pathogene [160, 161]. Dabei wirkt es direkt auf Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen und Makrophagen. Des Weiteren kann IL-10 die Phagozytose und die Abtötung der Pathogene durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies als Antwort auf IFN γ inhibieren [190, 191]. Im Serum [163] und in der Lunge von TB-Patienten [162] konnte eine gesteigerte Expression von IL-10 detektiert werden. Weiterhin zeigten Gerosa et al. ein gesteigertes Vorkommen von IFN γ und IL-10 produzierenden CD4⁺ T-Zellklonen in Bronchoalveolarlavage von TB-Patienten verglichen mit nicht *M. tuberculosis*-infizierten Kontrollen [192]. Es ist somit vorstellbar, dass miR-142-3p die Expression von IL-10 bei einer TB-Erkrankung reguliert. Die in dieser Arbeit gezeigte verminderte Expression von miR-142-3p in TB-Patienten verglichen mit LTBI sollte die IL-10 Sekretion steigern. Dadurch würde die Immunantwort auf das Pathogen inhibiert, was in einer aktiven Tuberkulose resultieren könnte.

5.1.5 Gemeinsame Zielgene der Kandidaten-miRNAs

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen potentieller Zielgene der Kandidaten-miRNAs konnten 107 Zielgene identifiziert werden, die gleichzeitig für zwei Kandidaten-miRNAs vorhergesagt wurden. Sechs Gene wurden als Ziel für drei Kandidaten-miRNAs vorhergesagt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression aller vier Kandidaten-miRNAs korreliert. Die Korrelation der Expression der miRNAs könnte ein Hinweis für die Induktion der miRNAs über ähnliche oder gleiche Prozesse sein. Dies macht im Folgenden den Überlapp von vorhergesagten Zielgenen wahrscheinlicher.

Phosphatase and tensin homolog (PTEN)

Ein für drei (miR-21, miR-26a und miR-29a) der vier differentiell exprimierten miRNAs in dieser Arbeit vorhergesagtes Zielgen ist PTEN. Für PTEN konnte eine Beteiligung an der Regu-

lation verschiedener Signalwege bereits gezeigt werden. Dazu gehören der Phosphoinositol-3-Kinase Weg (PI3K), der *janus kinase /signal transducers and activators of transcription* Weg (JAK/STAT), der *focal adhesion kinase* Weg (FAK) und erst kürzlich beschrieben, der *extracellular signal-regulated kinase 1/2* Weg (ERK 1/2) (zusammengefasst in [193]). PTEN ist weiterhin als ein Tumorsuppressorgen identifiziert [194] und fungiert in erster Linie als eine Lipidphosphatase. Durch die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) [195], hat PTEN inhibitorischen Einfluss auf den Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) Weg (zusammengefasst in [196]). So wurde beispielsweise in PIP₃ defizienten Mäusen ein gestörter Calcium-Influx nach TZR-Aktivierung, eine gestörte Proliferation und IL-2 Produktion nach Peptidstimulation gezeigt [197]. Auch eine Beteiligung des PI3K Weges an der T_H-Zelldifferenzierung und Expansion konnte im Mausmodell gezeigt werden [198]. PI3K *knock-out* T_H1 und T_H2 - Zellen zeigen eine verminderte Proliferation im Vergleich zu wildtyp Zellen. Weiterhin ist die Zytokin-induzierte T_H1 und T_H2 - Differenzierung inhibiert. Da miR-21, miR-26a und miR-29a bei einer Infektion mit *M. tuberculosis* im Vergleich zu LTBI vermindert sind, könnte dies also eine verminderte Inhibition der mRNA von PTEN in der Zelle zur Folge haben. Durch die erhöhte Aktivität von PTEN würde möglicherweise der zelluläre PIP₃ Level vermindert, was im Verlauf des PIP₃ Signalweges über Protein Kinase B (Akt) Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse (z.B. Apoptose, Proliferation, Proteinsynthese) hätte.

Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1)

Ein weiteres Molekül, welches für mehr als eine miRNA (miR-26a, miR-29a) als Zielgen vorhergesagt wurde war *suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS1). SOCS1 ist am Zytokin-induzierten JAK-STAT-Signalweg beteiligt und inhibiert die Aktivierung des Proteins STAT-1 [199]. Die Inhibition erfolgt über eine negative Rückkopplungsschleife zur Begrenzung der Zytokinsignaltransduktion [200]. Die Bindung von IFN γ an seinen spezifischen Rezeptor aktiviert STAT-1. Infolge der STAT-1 Aktivierung werden anschließend IFN γ -abhängige Gene exprimiert [200]. Es konnten eine gesteigerte SOCS1 Expression in T-Zellen von TB-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen nachweisen werden [201]. SOCS1 ist beteiligt an der T-Zelldifferenzierung und der Zytokinantwort [199], dabei wird SOCS1 hauptsächlich in T_H1 Zellen exprimiert [202]. In T_H1 Zellen ist die IFN γ Signaltransduktion abhängig von STAT-1, dessen Aktivität wiederum durch SOCS1 reguliert wird [203]. IFN γ ist von zentraler Bedeutung für die Kontrolle einer Infektion mit *M. tuberculosis* [87]. Es ist also denkbar, dass durch die in dieser Arbeit detektierte verminderte Expression von miR-26a und miR-29a in CD4⁺ T-Zellen TB-Patienten verglichen mit LTBI zu einem erhöhten Anteil translatierbarer mRNA von SOCS1 führen. Die Signaltransduktionskaskade von IFN γ würde durch den gesteigerten Anteil von SOCS1 möglicherweise zu früh und schnell abgeschaltet und die Funktionalität der T-Zellen einschränkt. Weiterhin konnte in Makrophagen gezeigt werden, dass SOCS1 während einer Infektion mit BCG hoch reguliert wird [89]. Im Mausmodell verlieren Makrophagen nach einer *M. tuberculosis* Infektion

durch SOCS1 die Fähigkeit zur Kontrolle des Bakterienwachstums [204].

5.1.6 CD4⁺ T-Zellen für die miRNA Expressionsanalysen

Da CD4⁺ T-Zellen bei der Kontrolle einer Infektion mit *M. tuberculosis* eine zentrale Rolle spielen, wurde die initiale Studie auf CD4⁺ T-Zellen beschränkt. Analysen des Anteils *M. tuberculosis* spezifischer CD4⁺ T-Zellen im Menschen zeigen starke interindividuelle Schwankungen, wobei ein Anteil von ca. 1 % Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen meist nicht überschritten wird [205]. Trotz dieses geringen Vorkommens konnte eine vergleichbare miRNA Expression zwischen den einzelnen Spendern detektiert werden. Bereits geringe Spenderzahlen reichten aus, um signifikante Unterschiede zu detektieren. Für Neutrophile und Monozyten konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL1 β die Expression von miR-9 induzieren [206]. Möglicherweise beeinflussen die *M. tuberculosis* spezifischen T-Zellen sich in ihrer Umgebung befindliche nicht-spezifische T-Zellen auf eine ähnliche Weise. Wodurch die Expression der Kandidaten-miRNAs in den T-Zellen inhibiert würde. Eine weitere denkbare Erklärung wäre, dass der tatsächliche Anteil *M. tuberculosis*-spezifischer CD4⁺ T-Zellen deutlich höher ist, als der mit den derzeit verfügbaren Antigenen nachweisbare Anteil.

5.2 Expression der Kandidaten-miRNAs bei T-Zellaktivierung, -differenzierung und -polarisierung

5.2.1 Expression der Kandidaten-miRNAs in aktivierten T-Zellen

Nach TZR-spezifischer Stimulation naiver CD4⁺ T-Zellen konnte eine Herunterregulation von miR-26a im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt ist eines der für miR-26a vorhergesagten Zielgenen Pim-1. Bei Pim-1 handelt es sich um ein Protoonkogen (zusammengefasst in [207]). Eine Vielzahl der identifizierten Bindungspartner von Pim-1 sind in den Verlauf des Zellzyklus und Apoptose involviert. Beispielsweise steigert Pim-1 durch Phosphorylierung den positiven Effekt des Moleküls Cdc25A auf das Fortlaufen des Zellzyklus [208], so dass die Proliferation der Zellen gefördert wird. Weiterhin inaktiviert Pim-1 durch Phosphorylierung das proapoptotische Protein Bad. Da die Inaktivierung von Bad die Aktivität des anti-apoptotischen Bcl-2 erhöht, wird so das Überleben der Zelle vermittelt [209]. Es ist also denkbar, dass durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigte verminderte Expression von miR-26a nach Stimulation naiver CD4⁺ T-Zellen eine verminderte Inhibition der mRNA von Pim-1 vorliegt. Somit würde die Proliferation der Zellen gefördert und die Apoptose verhindert. Zusätzlich wurde die beschriebene Korrelation der miR-155 Expression mit der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen [150] im Rahmen der in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigt.

5.2.2 Expression der Kandidaten-miRNAs in T-Zellsubpopulationen

Die Expressionsanalyse der Kandidaten miRNAs in T-Zellsubpopulation ergab im Mittel keine signifikant differentiell exprimierte miRNA. Trotzdem legen veröffentlichte Studien zur miRNA Expression in CD8⁺ T-Zellpopulationen eine Beteiligung von miRNAs an der T-Zellentwicklung und -differenzierung nahe [210]. Möglicherweise sind die hohen interindividuellen Schwankungen der miRNA Expression Ursache für einen nicht nachweisbaren Effekt. Allerdings deuten die Ergebnisse der Einzeluntersuchungen eine differentielle Expression für miR-21 und miR-29a in T-Zellsubpopulationen an. Rossi et al. analysierten eine Vielzahl von T-Zellstadien bezüglich der Expression diverser miRNAs [211]. Dabei wurden auch die miR-21 Expression in CD4⁺ naive und Gedächtnis-T-Zellen untersucht. Es konnte eine leicht gesteigerte Expression von miR-21 in Gedächtnis-T-Zellen verglichen mit naiven T-Zellen detektiert werden. Diese Analyse unterstützt die in dieser Arbeit angedeutete gesteigerte Expression von miR-21 für Gedächtnis-T-Zellen in dem gezeigten repräsentativen Beispiel. Allerdings deuten die Ergebnisse für die Expression der miRNA-Kandidaten in T-Zellsubpopulationen auch auf den Einfluss weiterer Faktoren hin, da die interindividuellen Schwankungen und die Schwankungen der miRNA Expression zwischen den T-Zellpopulationen sehr hoch waren.

5.2.3 Expression der Kandidaten-miRNAs in T-Zellklonen mit distinktem Zytokinprofil

Für miR-155 konnte nach exogener Expression in murinen CD4⁺ T-Zellen eine erhöhte T_H1 Differenzierung gezeigt werden [212]. Da für miR-155 bisher nur dieser Zusammenhang mit der T_H-Zelldifferenzierung beschrieben ist, wurde in T-Zellklonen die Expressionsanalyse von miR-155 mit einbezogen. In dieser Arbeit konnte für miR-155 eine erhöhte Expression in T_H1 und T_H17/1, verglichen mit T_H17 Klonen detektiert werden. Die Stimulation der T-Zellklone mit distinktem Zytokinprofil induzierte signifikante Unterschiede für miR-29a und miR-155, sowie Tendenzen für miR-26a und miR-142-3p.

Als Zielmolekül von miR-155 wurde der IFN γ R α identifiziert [212]. Dabei induziert die exogene Expression von miR-155 eine verminderte Expression von IFN γ R α . Ein Effekt, welcher unter T_H1-polarisierenden, aber nicht T_H2-polarisierenden Bedingungen beobachtet wurde. Die Bindung von IFN γ an seinen Rezeptor kann zur Inhibition der Proliferation und zur Induktion von Apoptose führen [213]. Es ist also denkbar, dass die erhöhte Expression von miR-155 in T_H1 und T_H17/1 T-Zellklonen die Expression von IFN γ R α inhibiert. Das von den T_H1 und T_H17/1 T-Zellklonen sekretierte IFN γ könnte damit nicht die Proliferation differenzierten T-Zellklone inhibieren, oder die Apoptose fördern. Dadurch würde das Überleben der T_H1 und T_H1-assoziierten T-Zellen gesichert. Andere T_H-Zellpopulationen, wie T_H2 oder T_H17 Zellen, dagegen könnten durch die Sekretion von IFN γ in Bezug auf Proliferation gehemmt und Apoptose gefördert werden. Der Effekt der Inhibition der T_H2-Polarisierung durch T_H1 sekretierte

Zytokine ist bereits beschrieben [214, 215, 216]. Allerdings unterliegen gerade die Ergebnisse der miRNA Expression in T-Zellklonen starken Schwankungen. Eine mögliche Ursache ist ein Einfluss von Kulturbedingungen. Desweiteren unterscheiden sich die einzelnen T-Zellklone zum Teil deutlich im prozentualen Anteil ihres exprimierten Signaturzytokins. Auch wenn bei den in dieser Arbeit erhobenen Daten im Mittel keine differentielle Expression der Kandidaten-miRNAs in T-Zellklonen mit distinkten Zytokinprofil detektiert werden konnte, können Unterschiede nicht ausgeschlossen werden.

Für miR-29a und miR-142-3p gibt es bisher keine Beschreibungen bezüglich der Funktion in T_H17 Zellen. Allerdings konnte für miR-142-3p gezeigt werden, dass eine Inhibition dieser miRNA zur Überaktivierung von $CD4^+$ T-Zellen führt [183]. Möglicherweise trägt miR-142-3p zur Kontrolle des Aktivierungsstatus der T_H17 Klone bei. Weiterhin findet eine stärkere Hochregulation von miR-29a und miR-142-3p nach Stimulation in T_H17 -Klonen verglichen mit T_H1 bzw. $T_H17/1$ Klonen statt. Daher sollte die Bedeutung dieser zwei miRNAs für die Funktion und Differenzierung von T_H17 Klonen näher charakterisiert werden.

5.3 Modulation der miRNA Expression in $CD4^+$ T-Zellen

Zur Validierung identifizierter Zielgene in $CD4^+$ T-Zellen sollten in dieser Arbeit zwei Systeme anhand von miR-29a etabliert werden. Für die exogenen Expression von miR-29a wurde das lentivirale System, basierend auf LeGO-Vektoren verwandt. Für die Inhibition der Funktion von miR-29a wurden Antagomirs verwandt.

Die exogene Expression von miR-29a führte nur in HEK-293T Zellen zum Erfolg, wobei in $CD4^+$ T-Zellen keine gesteigerte Expression von miR-29a nach Transduktion erreicht werden konnte. Die Ursache hierfür bedarf weiterer Analysen. Durch die Analyse der Expression des Vorläufers der reifen miR-29a (pri-miR-29a) konnte lediglich gezeigt werden, dass der Reifungsprozess bzw. die Prozessierung der verwandten Sequenz für miR-29a in den LeGO-Vektoren grundsätzlich möglich ist. Warum die exogene Expression in $CD4^+$ T-Zellen nicht erreicht werden konnte, ist mit der hier verwandten Methode allerdings nicht definierbar. Weiterhin war die basale Expression der pre-miR-29a in T-Zellen verglichen mit HEK293T Zellen auch bei Transduktion mit dem Kontrollvektor bereits erhöht. Dies könnte Ursache der Vorstimulation der T-Zellen sein. Es ist denkbar, dass die Vorstimulation die Expression weiterer miRNAs induziert und so die miRNA Prozessierung die Auslastungsgrenze erreicht. Möglicherweise müsste zunächst eine Inhibition der Prozessierung anderer miRNAs induziert werden, damit anschließend miR-29a überexprimiert werden kann.

Die Etablierung der Transfektion $CD4^+$ T-Zellen mit Antagomir-29a war erfolgreich. Die Analyse der Zytokinproduktion zeigte allerdings keine wie im Mausmodell beschriebene wirksame und spezifische Inhibition von $IFN\gamma$ durch die miR-29 Familie (miR-29a, -29b, -29c) [1]. T-bet und Eomes, zwei Schlüsseltranskriptionsfaktoren der $IFN\gamma$ Expression, wurden in Mäusen als

direkte Zielgene der miR-29 Familie identifiziert. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Großteil der Experimente mit Hilfe der exogenen Expression oder Inhibition von miR-29b durchgeführt wurde. Die drei miRNAs der miR-29 Familie unterscheiden sich kaum voneinander. Die *seed-Sequenz* ist identisch. Sie unterscheiden sich nur am 3'-Ende in maximal vier Nukleotiden [176]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in humanen CD4⁺ T-Zellen bestimmt und es konnte keine Korrelation der miR-29a Expression mit der IFN γ Sekretion detektiert werden. Möglicherweise reicht dieser Unterschied jedoch für einen geringeren Einfluss von miR-29a im Vergleich zu miR-29b auf die IFN γ Expression aus. Auch könnte die Herunterregulation von miR-29a für einen Effekt auf die IFN γ Expression nicht ausreichend sein. Möglicherweise benötigt die Expression von IFN γ im Menschen nicht die Feinregulation durch miR-29a, weil andere, bisher nicht bekannte Mechanismen die IFN γ Expression stabil halten. Weiterhin könnten im Menschen weitere miRNAs existieren, welche die Expression von IFN γ aufrechterhalten. Unterstützt wird diese Möglichkeit durch die in dieser Arbeit gezeigte Korrelation der Expression von miR-29a mit der Expression der anderen drei Kandidaten-miRNAs.

5.4 Unterschiede der miRNA Expression in CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten rekrutiert in verschiedenen Ländern

Die Analyse der Kandidaten-miRNA Expression eines Kollektives aus einem Land mit niedriger TB-Inzidenz (Deutschland) ergab eine verminderte Expression von miR-21, miR-26a, miR-29a und miR-142-3p in CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten verglichen mit LTBI. Die Expressionsanalyse dieser vier miRNAs in CD4⁺ T-Zellen von TB-Patienten und Kontaktpersonen aus einem Land mit hoher TB-Inzidenz (Ghana) dagegen zeigte keine differentielle Expression. Die Ursachen hierfür sind unklar. Bei den Kontaktpersonen des ghanaischen Kollektives konnte aufgrund technischer Probleme keine Unterscheidung zwischen LTBI und nicht *M. tuberculosis*-infizierten Kontrollen gemacht werden. Der Vergleich der Kandidaten-miRNA Expression im deutschen Kollektiv zeigte jedoch keine differentielle Expression der miRNAs zwischen nicht *M. tuberculosis*-infizierten Kontrollen und LTBI. Auch zeigen beide Kollektive kaum Streuung der Daten. Eine weitere Ursache könnte in der Infektion mit unterschiedlichen *M. tuberculosis* Stämmen der untersuchten Patienten aus den zwei Ländern liegen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass drei der am häufigsten auftretenden *M. tuberculosis* Stämme sich in Makrophagen unterschiedlich vermehren und zu einer unterschiedlichen Zytokininduktion führen [217]. Damit kommt es zu einem unterschiedlichen Einfluss der Makrophagen, als Antigen-präsentierende Zellen, auf die Differenzierung und Aktivität der *M. tuberculosis*-spezifischen T-Zellen. Dies könnte eine veränderte Expression von miRNAs zur Folge haben.

5.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit legt eine Regulation der humanen T-Zellantwort durch miR-21, miR-26a, miR-29a und miR-142-3p bei der TB nahe. In zukünftigen Studien sollen daher die den Kandidaten-miRNAs zugrunde liegenden Regulationsmechanismen genauer charakterisiert werden. Hierfür werden durch Modulation Kandidaten-miRNA Expression vorhergesagte Zielgene untersucht. Weiterhin legt die Korrelation der Expression der Kandidaten-miRNAs einen Einfluss der miRNAs miR-21, miR-26a, miR-142-3p auf die IFN γ Expression in T-Zellen nahe. Zur Verifizierung dieser These sollen mehrere Kandidaten-miRNAs gleichzeitig herunterreguliert oder überexprimiert werden. Interessant wäre ebenfalls die Charakterisierung der Expression der Kandidaten miRNAs in weiteren polarisierten T-Zellpopulationen wie T_{reg} und T_{H2}-Zellen. Aufgrund der Streuung der miRNA Expression in T-Zellklonen mit distinktem Zytokinprofil sollte die Anzahl der Proben für die Kandidaten-miRNA Analysen erhöht werden, gleiches gilt für die Gruppengröße der untersuchten Patienten. Da Makrophagen bei der Kontrolle der Infektion mit *M. tuberculosis* ebenfalls eine zentrale Rolle spielen, wäre die Analyse der Expression der Kandidaten-miRNAs in diesen Zellen ebenfalls interessant.

6 Anhang

6.1 Nukleotidsequenz der pre-miR-29a

ATG ACT GAT TTC TTT TGG TGT TCA GAG TCA ATA TAA TTT TCT AGC ACC ATC TGA
AAT CGG TTA T

Quelle: http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MIMAT0000086

Abbildungsverzeichnis

1.1.1 MicroRNAs Biogenese	2
1.2.1 Geschätzte Tuberkulose Inzidenz im Jahr 2010	8
1.3.1 T-Zellpopulationen	12
3.8.1 Vektorkarten der verwandten LeGO-Vektoren und pSUPER	30
3.9.1 Verlauf der lentiviralen Transduktion	32
4.1.1 <i>Ex vivo</i> miRNA Expression in CD4 ⁺ T-Zellen von Kontrollen, TB-Patienten und LTBI aus Deutschland	44
4.1.2 <i>Ex vivo</i> miRNA Expression in T-Zellsubpopulationen	45
4.1.3 MiRNA Expression nach <i>in vitro</i> Stimulation naiver T-Zellen	46
4.1.4 Zytokinprofil von T-Zellklonen	47
4.1.5 Expression der Kandidaten miRNAs und miR-155 in T-Zellklonen mit distink- tem Zytokinprofil	48
4.1.6 Relative Expression der Kandidaten-miRNAs in T-Zellklonen nach Restimu- lation.	49
4.2.1 Überlapp der Zielgene zwischen den Kandidaten-miRNAs	50
4.2.2 Korrelation der Expression der Kandidaten-miRNAs.	52
4.2.3 Transduktion von HEK293T Zellen mit LeGO-iG2_miR-29a.	54
4.2.4 Transduktion von HEK293T Zellen mit LeGO-G_miR-29a	55
4.2.5 Transduktion von HEK293T Zellen mit LeGO-G_H1.miR-29a	56
4.2.6 Transduktion von CD4 ⁺ T-Zellen mit LeGO-G_H1.miR-29a	57
4.2.7 Expression von pri-miR-29a in HEK293T und CD4 ⁺ T-Zellen nach Transduk- tion mit LeGO-G_H1.miR-29a	58
4.2.8 Transduktionseffizienz in Abhängigkeit der DharmaFect 4 Menge	59
4.2.9 Transduktionseffizienz in Abhängigkeit der Antagomir Konzentration	60
4.2.10 Transfektion von T-Zellen mit Antagomir-29a	61
4.3.1 <i>Ex vivo</i> miRNA Expression in CD4 ⁺ T-Zellen von TB-Patienten und Kontakt- personen aus Ghana	63
4.3.2 Kinetik der <i>ex vivo</i> Expression der Kandidaten-miRNAs in TB-Patienten aus Ghana	64

Literaturverzeichnis

- [1] D. F. Steiner, M. F. Thomas, J. K. Hu, Z. Yang, J. E. Babiarz, C. D. Allen, M. Matloubian, R. Blleloch, and K. M. Ansel, "MicroRNA-29 regulates T-box transcription factors and interferon-gamma production in helper T cells," *Immunity*, vol. 35, no. 2, pp. 169–181.
- [2] T. Du and P. D. Zamore, "microPrimer: the biogenesis and function of microRNA.," *Development (Cambridge, England)*, vol. 132, pp. 4645–52, Nov. 2005.
- [3] X. Cai, C. H. Hagedorn, and B. R. Cullen, "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs.," *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 10, pp. 1957–66, Dec. 2004.
- [4] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, and V. N. Kim, "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.," *The EMBO journal*, vol. 23, pp. 4051–60, Oct. 2004.
- [5] I. Flor and J. Bullerdiek, "The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours.," *The Journal of pathology*, vol. 227, pp. 270–4, July 2012.
- [6] A. Rodriguez, S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst, and A. Bradley, "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units.," *Genome research*, vol. 14, pp. 1902–10, Oct. 2004.
- [7] N. R. Smalheiser and W. T. S. Mc, "Correspondence EST analyses predict the existence of a population of chimeric microRNA precursor-mRNA transcripts expressed in normal human and mouse tissues.," *Genome Biology*, vol. 4, no. 7, pp. 403–5, 2003.
- [8] B. Wightman, I. Ha, and G. Ruvkun, "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*.," *Cell*, vol. 75, pp. 855–62, Dec. 1993.
- [9] M. Landthaler, A. Yalcin, and T. Tuschl, "The Human DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 and Its Drosophila Homolog Are Required for miRNA Biogenesis," *Current Biology*, vol. 14, no. 23, pp. 2162–67, 2004.
- [10] Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Rasmussen, S. Kim, and V. N. Kim, "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.," *Nature*, vol. 425, pp. 415–9, Sept. 2003.

- [11] A. M. Denli, B. B. J. Tops, R. H. a. Plasterk, R. F. Ketting, and G. J. Hannon, "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.," *Nature*, vol. 432, pp. 231–5, Nov. 2004.
- [12] J. Han, Y. Lee, K.-H. Yeom, J.-W. Nam, I. Heo, J.-K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B.-T. Zhang, and V. N. Kim, "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex.," *Cell*, vol. 125, pp. 887–901, June 2006.
- [13] M. T. Bohnsack, "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs," *Rna*, vol. 10, pp. 185–191, Feb. 2004.
- [14] E. Lund, S. Güttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, and U. Kutay, "Nuclear export of microRNA precursors.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 303, pp. 95–8, Jan. 2004.
- [15] R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, and B. R. Cullen, "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs.," *Genes and development*, vol. 17, pp. 3011–6, Dec. 2003.
- [16] a. Grishok, a. E. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, I. Ha, D. L. Baillie, a. Fire, G. Ruvkun, and C. C. Mello, "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing.," *Cell*, vol. 106, pp. 23–34, July 2001.
- [17] D. P. Bartel, "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.," *Cell*, vol. 136, no. 2, pp. 215–233, 2009.
- [18] R. I. Gregory, T. P. Chendrimada, N. Cooch, and R. Shiekhattar, "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing.," *Cell*, vol. 123, pp. 631–40, Nov. 2005.
- [19] A. D. Haase, L. Jaskiewicz, H. Zhang, S. Lainé, R. Sack, A. Gatignol, and W. Filipowicz, "TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing.," *EMBO reports*, vol. 6, pp. 961–7, Oct. 2005.
- [20] T. P. Chendrimada, R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, and R. Shiekhattar, "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing.," *Nature*, vol. 436, pp. 740–4, Aug. 2005.
- [21] W. Sun, Y.-S. Julie Li, H.-D. Huang, J. Y.-J. Shyy, and S. Chien, "microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems.," *Annual review of biomedical engineering*, vol. 12, pp. 1–27, Aug. 2010.
- [22] M. Mraz, J. Mayer, S. Pospisilova, and C. Republic, "MicroRNA Biogenesis, Functionality and Cancer Relevance," *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, vol. 150, no. 2, pp. 205–215, 2006.

- [23] O. Hobert, "Gene regulation by transcription factors and microRNAs.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 319, pp. 1785–6, Mar. 2008.
- [24] L. a. O'Neill, F. J. Sheedy, and C. E. McCoy, "MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 11, pp. 163–75, Mar. 2011.
- [25] J. Contreras and D. S. Rao, "MicroRNAs in inflammation and immune responses.," *Leukemia*, vol. 26, pp. 404–13, Mar. 2012.
- [26] M. P. Boldin, K. D. Taganov, D. S. Rao, L. Yang, J. L. Zhao, M. Kalwani, Y. Garcia-Flores, M. Luong, A. Devrekanli, J. Xu, G. Sun, J. Tay, P. S. Linsley, and D. Baltimore, "miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 208, pp. 1189–201, June 2011.
- [27] L.-F. Lu, M. P. Boldin, A. Chaudhry, L.-L. Lin, K. D. Taganov, T. Hanada, A. Yoshimura, D. Baltimore, and A. Y. Rudensky, "Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses.," *Cell*, vol. 142, pp. 914–29, Sept. 2010.
- [28] J. L. Zhao, D. S. Rao, M. P. Boldin, K. D. Taganov, R. M. O'Connell, and D. Baltimore, "NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies.," *PNAS*, vol. 108, pp. 9184–9, May 2011.
- [29] C. Xiao, D. P. Calado, G. Galler, T.-H. Thai, H. C. Patterson, J. Wang, N. Rajewsky, T. P. Bender, and K. Rajewsky, "MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb.," *Cell*, vol. 131, pp. 146–59, Oct. 2007.
- [30] T. P. Bender, C. S. Kremer, M. Kraus, T. Buch, and K. Rajewsky, "Critical functions for c-Myb at three checkpoints during thymocyte development.," *Nature immunology*, vol. 5, pp. 721–9, July 2004.
- [31] F. J. Sheedy, E. Palsson-McDermott, E. J. Hennessy, C. Martin, J. J. O'Leary, Q. Ruan, D. S. Johnson, Y. Chen, and L. a. J. O'Neill, "Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21.," *Nature immunology*, vol. 11, pp. 141–7, Feb. 2010.
- [32] G. Tang, B. J. Reinhart, D. P. Bartel, and P. D. Zamore, "A biochemical framework for RNA silencing in plants.," *Genes & development*, vol. 17, pp. 49–63, Jan. 2003.
- [33] C. Llave, Z. Xie, K. D. Kasschau, and J. C. Carrington, "Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 297, pp. 2053–6, Sept. 2002.
- [34] M. W. Rhoades, B. J. Reinhart, L. P. Lim, C. B. Burge, B. Bartel, and D. P. Bartel, "Prediction of plant microRNA targets.," *Cell*, vol. 110, pp. 513–20, Aug. 2002.

- [35] J. Brennecke, A. Stark, R. B. Russell, and S. M. Cohen, "Principles of microRNA-target recognition.," *PLoS biology*, vol. 3, p. e85, Mar. 2005.
- [36] B. P. Lewis, C. B. Burge, and D. P. Bartel, "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.," *Cell*, vol. 120, pp. 15–20, Jan. 2005.
- [37] X. Xie, J. Lu, E. J. Kulbokas, T. R. Golub, V. Mootha, K. Lindblad-Toh, E. S. Lander, and M. Kellis, "Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals.," *Nature*, vol. 434, pp. 338–45, Mar. 2005.
- [38] P. H. Olsen and V. Ambros, "The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation.," *Developmental biology*, vol. 216, pp. 671–80, Dec. 1999.
- [39] H. Guo, N. T. Ingolia, J. S. Weissman, and D. P. Bartel, "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels.," *Nature*, vol. 466, pp. 835–40, Aug. 2010.
- [40] A. Rodriguez, E. Vigorito, S. Clare, M. V. Warren, P. Couttet, D. R. Soond, S. van Dongen, R. J. Grocock, P. P. Das, E. a. Miska, D. Vetrie, K. Okkenhaug, A. J. Enright, G. Dougan, M. Turner, and A. Bradley, "Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 316, pp. 608–11, Apr. 2007.
- [41] T.-H. Thai, D. P. Calado, S. Casola, K. M. Ansel, C. Xiao, Y. Xue, A. Murphy, D. Fren-dewey, D. Valenzuela, J. L. Kutok, M. Schmidt-Supprian, N. Rajewsky, G. Yancopoulos, A. Rao, and K. Rajewsky, "Regulation of the germinal center response by microRNA-155.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 316, pp. 604–8, Apr. 2007.
- [42] E. a. Miska, E. Alvarez-Saavedra, A. L. Abbott, N. C. Lau, A. B. Hellman, S. M. McGonagle, D. P. Bartel, V. R. Ambros, and H. R. Horvitz, "Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability.," *PLoS genetics*, vol. 3, p. e215, Dec. 2007.
- [43] E. Alvarez-Saavedra and H. R. Horvitz, "Many families of *C. elegans* microRNAs are not essential for development or viability.," *Current biology : CB*, vol. 20, pp. 367–73, Feb. 2010.
- [44] Y. Wang, S. Baskerville, A. Shenoy, J. E. Babiarz, L. Baehner, and R. Blelloch, "Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation.," *Nature genetics*, vol. 40, pp. 1478–83, Dec. 2008.
- [45] L. P. Lim, N. C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J. M. Schelter, J. Castle, D. P. Bartel, P. S. Linsley, and J. M. Johnson, "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs.," *Nature*, vol. 433, pp. 769–73, Feb. 2005.

- [46] A. Stark, J. Brennecke, N. Bushati, R. B. Russell, and S. M. Cohen, "Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution.," *Cell*, vol. 123, pp. 1133–46, Dec. 2005.
- [47] R. M. O'Connell, D. S. Rao, A. a. Chaudhuri, and D. Baltimore, "Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 10, pp. 111–22, Feb. 2010.
- [48] L. T. Jeker and J. a. Bluestone, "Small RNA regulators of T cell-mediated autoimmunity.," *Journal of clinical immunology*, vol. 30, pp. 347–57, May 2010.
- [49] Y. Dai, Y.-S. Huang, M. Tang, T.-Y. Lv, C.-X. Hu, Y.-H. Tan, Z.-M. Xu, and Y.-B. Yin, "Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients.," *Lupus*, vol. 16, pp. 939–46, Jan. 2007.
- [50] X. Zhao, Y. Tang, B. Qu, H. Cui, S. Wang, L. Wang, X. Luo, X. Huang, J. Li, S. Chen, and N. Shen, "MicroRNA-125a Contributes to Elevated Inflammatory Chemokine RANTES Levels via Targeting KLF13 in Systemic Lupus Erythematosus," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 62, no. 11, pp. 3425–3435, 2010.
- [51] M. Feuerer, J. a. Hill, D. Mathis, and C. Benoist, "Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes.," *Nature immunology*, vol. 10, pp. 689–95, July 2009.
- [52] X. Zhou, L. T. Jeker, B. T. Fife, S. Zhu, M. S. Anderson, M. T. McManus, and J. a. Bluestone, "Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 205, pp. 1983–91, Sept. 2008.
- [53] C. Esau, S. Davis, S. F. Murray, X. X. Yu, S. K. Pandey, M. Pear, L. Watts, S. L. Booten, M. Graham, R. McKay, A. Subramaniam, S. Propp, B. a. Lollo, S. Freier, C. F. Bennett, S. Bhanot, and B. P. Monia, "miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting.," *Cell metabolism*, vol. 3, pp. 87–98, Feb. 2006.
- [54] A. Lujambio and S. W. Lowe, "The microcosmos of cancer.," *Nature*, vol. 482, pp. 347–55, Feb. 2012.
- [55] M. Selbach, B. Schwanhäusser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, and N. Rajewsky, "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs.," *Nature*, vol. 455, pp. 58–63, Sept. 2008.
- [56] D. Baek, J. Villén, C. Shin, F. D. Camargo, S. P. Gygi, and D. P. Bartel, "The impact of microRNAs on protein output.," *Nature*, vol. 455, pp. 64–71, Sept. 2008.

- [57] L.-F. Lu, T.-H. Thai, D. P. Calado, A. Chaudhry, M. Kubo, K. Tanaka, G. B. Loeb, H. Lee, A. Yoshimura, K. Rajewsky, and A. Y. Rudensky, "Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein.," *Immunity*, vol. 30, pp. 80–91, Jan. 2009.
- [58] J. R. Zibert, M. B. Lø vendorf, T. Litman, J. r. Olsen, B. Kaczkowski, and L. Skov, "MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis.," *Journal of dermatological science*, vol. 58, pp. 177–85, June 2010.
- [59] E. Sonkoly, T. Wei, P. C. J. Janson, A. Sääf, L. Lundeberg, M. Tengvall-Linder, G. Norstedt, H. Alenius, B. Homey, A. Scheynius, M. Stå hle, and A. Pivarcsi, "MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis?," *PloS one*, vol. 2, p. e610, Jan. 2007.
- [60] E. Sonkoly, M. Stå hle, and a. Pivarcsi, "MicroRNAs: novel regulators in skin inflammation.," *Clinical and experimental dermatology*, vol. 33, pp. 312–5, May 2008.
- [61] K. D. Taganov, M. P. Boldin, K.-j. Chang, and D. Baltimore, "NF- κ B-dependent induction of miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses," *PNAS*, vol. 103, no. 33, pp. 6–11, 2006.
- [62] A. Junker, M. Krumbholz, S. Eisele, H. Mohan, F. Augstein, R. Bittner, H. Lassmann, H. Wekerle, R. Hohlfeld, and E. Meinl, "MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47.," *Brain : a journal of neurology*, vol. 132, pp. 3342–52, Dec. 2009.
- [63] R. Ross, "Atherosclerosis - An Inflammatory Disease," *Mechanisms of Disease*, vol. 340, no. 2, pp. 115–126, 1999.
- [64] T. a. Harris, M. Yamakuchi, M. Ferlito, J. T. Mendell, and C. J. Lowenstein, "MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1.," *PNAS*, vol. 105, pp. 1516–21, Feb. 2008.
- [65] R. Triboulet, B. Mari, Y.-l. Lin, C. Chable-bessia, Y. Bennasser, K. Lebrigand, B. Cardinaud, T. Maurin, P. Barbry, V. Baillat, J. Reynes, P. Corbeau, K.-t. Jeang, and M. Benkirane, "Suppression of MicroRNA-Silencing Pathway by HIV-1 During Virus Replication," *Science*, vol. 315, no. 5818, pp. 1579–1582, 2007.
- [66] C. L. Jopling, M. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon, and P. Sarnow, "Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 309, pp. 1577–81, Sept. 2005.
- [67] L. N. Schulte, A. Eulalio, H.-J. Mollenkopf, R. Reinhardt, and J. Vogel, "Analysis of the host microRNA response to Salmonella uncovers the control of major cytokines by the let-7 family.," *The EMBO journal*, vol. 30, pp. 1977–89, May 2011.

- [68] A. K. D. Schnitger, A. Machova, R. U. Mueller, A. Androulidaki, B. Schermer, M. Pasparakis, M. Krönke, and N. Papadopoulou, "Listeria monocytogenes infection in macrophages induces vacuolar-dependent host miRNA response.," *PloS one*, vol. 6, p. e27435, Jan. 2011.
- [69] W H O, "Global Tuberculosis Control 2011," 2011.
- [70] C. Dye, S. Scheele, P. Dolin, M. C. Raviglione, and P. Page, "Global Burden of Tuberculosis Estimated Incidence , Prevalence , and Mortality by Country assessing present control efforts and," *JAMA*, vol. 282, no. 7, pp. 677–86, 2012.
- [71] F. Gordin and G. Slutkin, "The validity of acid-fast smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis.," *Archives of pathology & laboratory medicine*, vol. 114, pp. 1025–7, Oct. 1990.
- [72] B. A. Hanna, A. Ebrahimzadeh, L. B. Elliott, M. A. Morgan, S. M. Novak, S. Ruschgerdes, M. Acio, D. F. Dunbar, T. M. Holmes, H. Charles, C. Savthyakumar, A. M. Vannier, and C. H. Rexer, "Multicenter Evaluation of the BACTEC MGIT 960 System for Recovery of Mycobacteria," *Journal of clinical microbiology*, vol. 37, no. 3, pp. 1–6, 1999.
- [73] D. F. Welch, A. P. Guruswamy, S. J. Sides, C. H. Shaw, and M. J. Gilchrist, "Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method.," *Journal of clinical microbiology*, vol. 31, pp. 2178–84, Aug. 1993.
- [74] P. Andersen, M. E. Munk, J. M. Pollock, and T. M. Doherty, "Specific immune-based diagnosis of tuberculosis.," *Lancet*, vol. 356, pp. 1099–104, Sept. 2000.
- [75] E. Lee and R. S. Holzman, "Evolution and current use of the tuberculin test.," *Clinical infectious diseases*, vol. 34, pp. 365–70, Mar. 2002.
- [76] B. J. J. Huebner RE, Schein MF, "The tuberculin skin test," *Clin Infect Dis*, vol. 17, no. 6, pp. 968–975, 1993.
- [77] M. Pai and D. Menzies, "Interferon-gamma release assays: what is their role in the diagnosis of active tuberculosis?," *Clinical infectious diseases*, vol. 44, pp. 74–7, Jan. 2007.
- [78] R. Shi, N. Itagaki, and I. Sugawara, "Overview of anti-tuberculosis (TB) drugs and their resistance mechanisms.," *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 7, no. 11, pp. 1177–1185, 2007.
- [79] Robert-Koch-Institut, "RKI-Ratgeber: Tuberkulose," 2010.
- [80] Y. Zhang, "The magic bullets and tuberculosis drug targets.," *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 45, pp. 529–64, Jan. 2005.

- [81] A. Calmette, "Preventive vaccination against tuberculosis with BCG," *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 86, pp. 1481–90, 1931.
- [82] B. B. Trunz, P. Fine, and C. Dye, "Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness.," *Lancet*, vol. 367, pp. 1173–80, Apr. 2006.
- [83] G. Walzl, K. Ronacher, W. Hanekom, T. J. Scriba, and A. Zumla, "Immunological biomarkers of tuberculosis.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 11, pp. 343–54, May 2011.
- [84] R. S. Wallis, M. Pai, D. Menzies, T. M. Doherty, G. Walzl, M. D. Perkins, and A. Zumla, "Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice.," *Lancet*, vol. 375, pp. 1920–37, May 2010.
- [85] R. McNerney and P. Daley, "Towards a point-of-care test for active tuberculosis: obstacles and opportunities.," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 9, pp. 204–13, Mar. 2011.
- [86] C. B. E. Chee, K. W. KhinMar, S. H. Gan, T. M. Barkham, C. K. Koh, L. Shen, and Y. T. Wang, "Tuberculosis treatment effect on T-cell interferon-gamma responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens.," *The European respiratory journal*, vol. 36, pp. 355–61, Aug. 2010.
- [87] S. H. E. Kaufmann, "Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages.," *Annals of the rheumatic diseases*, vol. 61 Suppl 2, pp. ii54–8, Nov. 2002.
- [88] J. A. Armstrong and P. Hart, "Response of macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 134, no. 3, pp. 713–40, 1971.
- [89] K. Imai, T. Kurita-Ochiai, and K. Ochiai, "Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection promotes SOCS induction and inhibits IFN-gamma-stimulated JAK STAT signaling in J774 macrophages.," *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 39, pp. 173–180, Nov. 2003.
- [90] B. A. M. Cooper, D. K. Dalton, T. A. Stewart, J. P. Griffin, D. G. Russell, and I. M. Orme, "Disseminated Tuberculosis in Interferon 7 Gene-disrupted.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 178, no. 6, pp. 2243–7, 1993.
- [91] J. L. Flynn, M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffersps, C. J. Lowensteln, and R. Schreiber, "Tumor Necrosis Factor- α is required in the protective Immune Response against Mycobacterium tuberculosis.," *Immunity*, vol. 2, no. 6, pp. 561–72, 1995.
- [92] L. Helming and S. Gordon, "The molecular basis of macrophage fusion.," *Immunobiology*, vol. 212, pp. 785–93, Jan. 2007.

- [93] a. Fayyazi, B. Eichmeyer, a. Soruri, S. Schweyer, J. Herms, P. Schwarz, and H. J. Radzun, "Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis.," *The Journal of pathology*, vol. 191, pp. 417–25, Aug. 2000.
- [94] L. G. Wayne, "Dormancy of Mycobacterium tuberculosis and latency of disease.," *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, vol. 13, pp. 908–14, Nov. 1994.
- [95] S. Abul K Abbas, A.H.L. und Pillai, *Cellular and molecular Immunology*. 2010.
- [96] L. E. Harrington, R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver, "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.," *Nature immunology*, vol. 6, pp. 1123–32, Nov. 2005.
- [97] B. Stockinger and M. Veldhoen, "Differentiation and function of Th17 T cells.," *Current opinion in immunology*, vol. 19, pp. 281–6, June 2007.
- [98] K. I. Happel, P. J. Dubin, M. Zheng, N. Ghilardi, C. Lockhart, L. J. Quinton, A. R. Odden, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, and J. K. Kolls, "Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 202, pp. 761–9, Sept. 2005.
- [99] J. T. Harty, a. R. Tvinnereim, and D. W. White, "CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection.," *Annual review of immunology*, vol. 18, pp. 275–308, Jan. 2000.
- [100] K. Kleinsteuber, "Charakterisierung der Rolle von Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-3 bei der Aktivierung und Differenzierung von CD4+ T-Zellen," *Dissertation*, 2012.
- [101] M. DIANE V. H AVLIR , M.D., AND P ETER F. B ARNES, "Tuberculosis patients with human immunodeficiency virus infection," *The New England journal of medicine*, vol. 340, no. 5, pp. 367–373, 1999.
- [102] D. Banerjee, G. Rook, C. Leveton, S. Barnass, B. Champion, S. Lucas, B. D. E. Souza, M. Nicol, D. Banerjee, and G. Rook, "T-Cell-Mediated Protection of Mice against Virulent Mycobacterium tuberculosis," *Infection and immunity*, vol. 57, no. 2, pp. 390–95, 1989.
- [103] B. Kampmann, C. Hemingway, A. Stephens, R. Davidson, A. Goodsall, S. Anderson, M. Nicol, E. Schölvinck, D. Relman, S. Waddell, P. Langford, B. Sheehan, L. Semple, K. A. Wilkinson, R. J. Wilkinson, S. Ress, M. Hibberd, and M. Levin, "Acquired predisposition to mycobacterial disease due to autoantibodies to IFN- γ ," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 9, pp. 2480–88, 2005.

- [104] S. A. Oriss, T. B., McCarthy, "Crossregulation Between T Helper Cell (Th)1 and Th2: Inhibition of Th2 Proliferation by IFN- γ Involves Interference with IL-1," *The Journal of immunology*, vol. 158, no. 8, pp. 3666–72, 1997.
- [105] A. Noble, D. Z. Staynov, and A. R. Disorders, "Generation of rat Th2-like cells in vitro is interleukin-4-dependent and inhibited by interferon- γ ," *Immunology*, vol. 79, no. 4, pp. 562–567, 1993.
- [106] A. G. Bean, D. R. Roach, H. Briscoe, M. P. France, H. Korner, J. D. Sedgwick, and W. J. Britton, "Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 162, pp. 3504–11, Mar. 1999.
- [107] I. E. Flesch and S. H. Kaufmann, "Role of cytokines in tuberculosis.," *Immunobiology*, vol. 189, pp. 316–39, Nov. 1993.
- [108] R. Maini, E. W. St Clair, F. Breedveld, D. Furst, J. Kalden, M. Weisman, J. Smolen, P. Emery, G. Harriman, M. Feldmann, and P. Lipsky, "Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group.," *Lancet*, vol. 354, pp. 1932–9, Dec. 1999.
- [109] A. K. Abbas, K. M. Murphy, and A. Sher, "Functional diversity of helper T lymphocytes.," *Nature*, vol. 383, pp. 787–93, Oct. 1996.
- [110] K. A. Smith, "Interleukin-2: inception, impact, and implications.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 240, pp. 1169–76, May 1988.
- [111] F. D. Finkelman, T. Shea-donohue, J. Goldhill, C. A. Sullivan, S. C. Morris, B. Kathleen, W. C. Gause, and J. F. Urban, "Cytokine Regulation of Host Defense against Parasitic Gastrointestinal Nematodes: Lessons from Studies with Rodent Models," *Annual review of immunology*, vol. 15, pp. 505–33, 1997.
- [112] D. Elias, G. Mengistu, H. Akuffo, and S. Britton, "Are intestinal helminths risk factors for developing active tuberculosis?," *Tropical medicine & international health : TM & IH*, vol. 11, pp. 551–8, Apr. 2006.
- [113] R. Tristao-sa, R. Ribeiro-rodrigues, and L. T. Johnson, "Intestinal nematodes and pulmonary tuberculosis Nematóides intestinais e tuberculose pulmonar," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 35, no. 5, pp. 533–535, 2002.
- [114] T. Resende Co, C. S. Hirsch, Z. Toossi, R. Dietze, and R. Ribeiro-Rodrigues, "Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-Mycobacterium tuberculosis

immunity and clinical response to tuberculosis therapy.," *Clinical and experimental immunology*, vol. 147, pp. 45–52, Jan. 2007.

- [115] T. J. Scriba, B. Kalsdorf, F. Isaacs, J. Hofmeister, G. Black, H. Y. Hassan, R. J. Wilkinson, G. Walzl, S. J. Gelderbloem, H. Mahomed, D. Gregory, W. A. Hanekom, D.-a. Abrahams, and G. D. Hussey, "Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 180, pp. 1962–70, Feb. 2008.
- [116] X. Chen, M. Zhang, M. Liao, M. W. Graner, C. Wu, Q. Yang, H. Liu, and B. Zhou, "Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4+ T Cells.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 181, pp. 734–42, Apr. 2010.
- [117] A. M. Green, J. T. Mattila, C. L. Bigbee, K. S. Bongers, P. L. Lin, and J. L. Flynn, "CD4(+) regulatory T cells in a cynomolgus macaque model of Mycobacterium tuberculosis infection.," *The Journal of infectious diseases*, vol. 202, pp. 533–41, Aug. 2010.
- [118] V. Guyot-Revol, J. a. Innes, S. Hackforth, T. Hinks, and A. Lalvani, "Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 173, pp. 803–10, Apr. 2006.
- [119] J. P. Scott-Browne, S. Shafiani, G. Tucker-Heard, K. Ishida-Tsubota, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, M. J. Bevan, and K. B. Urdahl, "Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 204, pp. 2159–69, Sept. 2007.
- [120] J. L. Flynn, M. M. Goldstein, K. J. Triebold, B. Koller, and B. R. Bloom, "Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, pp. 12013–7, Dec. 1992.
- [121] D. G. R. Monica Hagedorn, Kyle H. Rohde, "Infection by Tubercular Mycobacteria Is Spread by Nonlytic Ejection from Their Amoeba Hosts," *Science*, vol. 323, no. 5922, pp. 1729–1733, 2009.
- [122] N. van der Wel, D. Hava, D. Houben, D. Fluitsma, M. van Zon, J. Pierson, M. Brenner, and P. J. Peters, "M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells.," *Cell*, vol. 129, pp. 1287–98, June 2007.
- [123] U. E. Schaible, F. Winau, P. a. Sieling, K. Fischer, H. L. Collins, K. Hagens, R. L. Modlin, V. Brinkmann, and S. H. E. Kaufmann, "Apoptosis facilitates antigen presentation to T

lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis.," *Nature medicine*, vol. 9, pp. 1039–46, Aug. 2003.

- [124] D. H. Canaday, R. J. Wilkinson, Q. Li, V. Clifford, R. F. Silver, and W. H. Boom, "CD4 + and CD8 + T Cells Kill Intracellular Mycobacterium tuberculosis by a Perforin and Fas/Fas Ligand-Independent Mechanism," *The Journal of immunology*, vol. 167, no. 5, pp. 7237–42, 2012.
- [125] M. Merkerova, M. Belickova, and H. Bruchova, "Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages.," *European journal of haematology*, vol. 81, pp. 304–10, Oct. 2008.
- [126] S. Monticelli, K. M. Ansel, C. Xiao, N. D. Socci, A. M. Krichevsky, T.-H. Thai, N. Rajewsky, D. S. Marks, C. Sander, K. Rajewsky, A. Rao, and K. S. Kosik, "MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system.," *Genome biology*, vol. 6, p. R71, Jan. 2005.
- [127] H. Wu, J. R. Neilson, P. Kumar, M. Manocha, P. Shankar, P. a. Sharp, and N. Manjunath, "miRNA profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells.," *PloS one*, vol. 2, p. e1020, Jan. 2007.
- [128] B. S. Cobb, T. B. Nesterova, E. Thompson, A. Hertweck, E. O'Connor, J. Godwin, C. B. Wilson, N. Brockdorff, A. G. Fisher, S. T. Smale, and M. Merkenschlager, "T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 201, pp. 1367–73, May 2005.
- [129] S. a. Muljo, K. M. Ansel, C. Kanellopoulou, D. M. Livingston, A. Rao, and K. Rajewsky, "Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 202, pp. 261–9, July 2005.
- [130] Q.-J. Li, J. Chau, P. J. R. Ebert, G. Sylvester, H. Min, G. Liu, R. Braich, M. Manoharan, J. Soutschek, P. Skare, L. O. Klein, M. M. Davis, and C.-Z. Chen, "miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection.," *Cell*, vol. 129, pp. 147–161, Apr. 2007.
- [131] R. Kumar, P. Halder, S. K. Sahu, M. Kumar, M. Kumari, K. Jana, Z. Ghosh, P. Sharma, M. Kundu, and J. Basu, "Identification of a novel role of ESAT-6-dependent miR-155 induction during infection of macrophages with Mycobacterium tuberculosis.," *Cellular microbiology*, June 2012.
- [132] T. X. Lu, A. Munitz, and M. E. Rothenberg, "MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression.," *Journal of immunology*, vol. 182, pp. 4994–5002, Apr. 2009.

- [133] J. Mattes, A. Collison, M. Plank, S. Phipps, and P. S. Foster, "Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of TH2 cells and the development of allergic airways disease.," *PNAS*, vol. 106, pp. 18704–9, Nov. 2009.
- [134] A. Liston, L.-F. Lu, D. O'Carroll, A. Tarakhovsky, and A. Y. Rudensky, "Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 205, pp. 1993–2004, Sept. 2008.
- [135] X. Zhou, L. T. Jeker, B. T. Fife, S. Zhu, M. S. Anderson, M. T. McManus, and J. a. Bluestone, "Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 205, pp. 1983–91, Sept. 2008.
- [136] M. M. W. Chong, J. P. Rasmussen, A. Y. Rudensky, A. Y. Rundensky, and D. R. Littman, "The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 205, pp. 2005–17, Sept. 2008.
- [137] B. Huang, J. Zhao, Z. Lei, S. Shen, D. Li, G.-X. Shen, G.-M. Zhang, and Z.-H. Feng, "miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA.," *EMBO reports*, vol. 10, pp. 180–5, Feb. 2009.
- [138] M. Divangahi, D. Desjardins, C. Nunes-Alves, H. G. Remold, and S. M. Behar, "Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis.," *Nature immunology*, vol. 11, pp. 751–8, Aug. 2010.
- [139] M. Chen, M. Divangahi, H. Gan, D. S. J. Shin, S. Hong, D. M. Lee, C. N. Serhan, S. M. Behar, and H. G. Remold, "Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 205, pp. 2791–801, Nov. 2008.
- [140] J. Hinchey, S. Lee, B. Y. Jeon, R. J. Basaraba, M. Manjunatha, B. Chen, J. Chan, M. Braunstein, I. M. Orme, S. C. Derrick, S. L. Morris, W. R. J. Jr, and S. A. Porcelli, "Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of Mycobacterium tuberculosis.," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 8, pp. 2279–88, 2007.
- [141] A. Cimmino, G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.-G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, and C. M. Croce, "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2.," *PNAS*, vol. 102, pp. 13944–9, Sept. 2005.
- [142] W. Ruan, J.-m. Xu, S.-b. Li, L.-q. Yuan, and R.-p. Dai, "Effects of down-regulation of microRNA-23a on TNF- α -induced endothelial cell apoptosis through caspase-dependent pathways.," *Cardiovascular research*, vol. 93, pp. 623–32, Mar. 2012.

- [143] H. W. Haiyan Zhang, Zhi Zuo, Xin Lu, Li Wang, "MiR-25 regulates apoptosis by targeting Bim in human ovarian cancer," *Oncology Reports*, vol. 27, no. 2, p. 594.
- [144] R. Chhabra, Y. K. Adlakha, M. Hariharan, V. Scaria, and N. Saini, "Upregulation of miR-23a-27a-24-2 cluster induces caspase-dependent and -independent apoptosis in human embryonic kidney cells.," *PloS one*, vol. 4, p. e5848, Jan. 2009.
- [145] T. R. Brummelkamp, R. Bernards, and R. Agami, "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 296, pp. 550–3, Apr. 2002.
- [146] K. Weber, U. Bartsch, C. Stocking, and B. Fehse, "A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology"(LeGO) vectors for functional gene analysis.," *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 16, pp. 698–706, Apr. 2008.
- [147] L. Cosmi, R. De Palma, V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato, "Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 205, pp. 1903–16, Aug. 2008.
- [148] K. Heesch, "Charakterisierung des Phänotyps und der Zytokinexpression von humanen NK-artigen T-Zellen und deren Bedeutung bei mykobakteriellen Infektionen," *Masterarbeit*, 2009.
- [149] B. Xiao, Z. Liu, B.-S. Li, B. Tang, W. Li, G. Guo, Y. Shi, F. Wang, Y. Wu, W.-D. Tong, H. Guo, X.-H. Mao, and Q.-M. Zou, "Induction of microRNA-155 during Helicobacter pylori infection and its negative regulatory role in the inflammatory response.," *The Journal of infectious diseases*, vol. 200, pp. 916–25, Sept. 2009.
- [150] D. Haasch, Y.-W. Chen, R. M. Reilly, X. G. Chiou, S. Koterski, M. L. Smith, P. Kroeger, K. McWeeny, D. N. Halbert, K. W. Mollison, S. W. Djuric, and J. M. Trevillyan, "T cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC.," *Cellular immunology*, vol. 217, no. 1-2, pp. 78–86, 2002.
- [151] J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, and M. Stoffel, "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'.," *Nature*, vol. 438, pp. 685–9, Dec. 2005.
- [152] V. Fulci, S. Chiaretti, M. Goldoni, G. Azzalin, N. Carucci, S. Tavolaro, L. Castellano, A. Magrelli, F. Citarella, M. Messina, R. Maggio, N. Peragine, S. Santangelo, F. R. Mauro, P. Landgraf, T. Tuschl, D. B. Weir, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, R. Sheridan, C. Sander,

- M. Zavolan, A. Guarini, R. Foà, and G. Macino, "Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia.," *Blood*, vol. 109, pp. 4944–51, June 2007.
- [153] S. Volinia, G. a. Calin, C.-G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris, and C. M. Croce, "A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.," *PNAS*, vol. 103, pp. 2257–61, Feb. 2006.
- [154] Y. Yang, X. Li, Q. Yang, X. Wang, Y. Zhou, T. Jiang, Q. Ma, and Y.-J. Wang, "The role of microRNA in human lung squamous cell carcinoma.," *Cancer genetics and cytogenetics*, vol. 200, pp. 127–33, July 2010.
- [155] L.-x. Yan, X.-f. Huang, Q. Shao, M.-y. Huang, and L. Deng, "MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage , lymph node metastasis and patient poor prognosis.," *RNA*, vol. 14, no. 11, pp. 2348–2360, 2008.
- [156] B. Qian, D. Katsaros, L. Lu, M. Preti, A. Durando, R. Arisio, L. Mu, and H. Yu, "High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1.," *Breast cancer research and treatment*, vol. 117, pp. 131–40, Sept. 2009.
- [157] Q. Yao, H. Xu, Q.-Q. Zhang, H. Zhou, and L.-H. Qu, "MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in He-La cervical carcinoma cells.," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 388, pp. 539–42, Oct. 2009.
- [158] H.-s. Yang, A. P. Jansen, R. Nair, K. Shibahara, A. K. Verma, J. L. Cmarik, and N. H. Colburn, "A novel transformation suppressor , Pcd4 , inhibits AP-1 transactivation but not NF-kB or ODC transactivation.," *Oncogene*, vol. 20, no. 6, pp. 669–75, 2001.
- [159] A. Hilliard, B. Hilliard, S.-j. Zheng, T. Miwa, W. Song, R. Göke, Y. H. Chen, and H. Sun, "Inflammation and Lymphoma Genesis by Translational Regulation of Autoimmune Programmed Cell Death 4," *The Journal of immunology*, vol. 177, no. 11, pp. 8095–102, 2012.
- [160] D. F. Florentino, A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard, and A. O. Garra, "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.," *The Journal of immunology*, vol. 147, no. 11, pp. 3815–22, 1991.
- [161] D. F. Fiorentino, A. Zlotnik, P. Vieira, T. R. Mosmann, M. Howard, K. W. Moore, and A. O'Garra, "IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.," *Journal of immunology*, vol. 146, pp. 3444–51, May 1991.

- [162] P. F. Barnes, S. Lu, J. S. Abrams, E. Wang, M. Yamamura, and R. L. Modlin, "Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis.," *Infection and immunity*, vol. 61, pp. 3482–9, Aug. 1993.
- [163] A. Verbon, N. Juffermans, and P. Speelman, "Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment," *Clinical and experimental immunology*, vol. 115, no. 1, pp. 113–116, 1999.
- [164] E. Stagakis, G. Bertsiyas, P. Verginis, M. Nakou, M. Hatziapostolou, H. Kritikos, D. Iliopoulos, and D. T. Boumpas, "Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression.," *Annals of the rheumatic diseases*, vol. 70, pp. 1496–506, Aug. 2011.
- [165] D. Iliopoulos, M. Kavousanaki, M. Ioannou, D. Boumpas, and P. Verginis, "The negative costimulatory molecule PD-1 modulates the balance between immunity and tolerance via miR-21.," *European journal of immunology*, vol. 41, pp. 1754–63, June 2011.
- [166] J. O. Jurado, I. B. Alvarez, V. Pasquinelli, G. J. Martinez, M. F. Quiroga, E. Abbate, R. M. Musella, H. E. Chuluyan, and E. Veronica, "Programmed Death (PD)-1: PD-Ligand1/PD-Ligand2 Pathway Inhibits T Cell Effector Functions during Human," *The Journal of immunology*, vol. 181, no. 1, pp. 116–25, 2012.
- [167] J. a. Chan, A. M. Krichevsky, and K. S. Kosik, "MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells.," *Cancer research*, vol. 65, pp. 6029–33, July 2005.
- [168] P. Di Carlo, A. Casuccio, A. Romano, D. Spicola, L. Titone, N. Caccamo, F. Dieli, C. Mamina, E. Pace, M. Gjomarkaj, M. Melis, and M. Tolomeo, "Lymphocyte apoptosis in children with central nervous system tuberculosis: a case control study.," *BMC pediatrics*, vol. 11, p. 108, Jan. 2011.
- [169] R. Visone, P. Pallante, a. Vecchione, R. Cirombella, M. Ferracin, a. Ferraro, S. Volinia, S. Coluzzi, V. Leone, E. Borbone, C.-G. Liu, F. Petrocca, G. Troncone, G. a. Calin, a. Scarpa, C. Colato, G. Tallini, M. Santoro, C. M. Croce, and a. Fusco, "Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas.," *Oncogene*, vol. 26, pp. 7590–5, Nov. 2007.
- [170] S. Sander, L. Bullinger, K. Klapproth, K. Fiedler, H. a. Kestler, T. F. E. Barth, P. Möller, S. Stilgenbauer, J. R. Pollack, and T. Wirth, "MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a.," *Blood*, vol. 112, pp. 4202–12, Nov. 2008.
- [171] M. Jacobsen, D. Repsilber, K. Kleinsteuber, A. Gutschmidt, S. Schommer-Leitner, G. Black, G. Walzl, and S. H. E. Kaufmann, "Suppressor of cytokine signaling-3 is affected in T-cells

from tuberculosis TB patients.," *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 17, pp. 1323–31, Sept. 2011.

- [172] R. Wang, C. P. Dillon, L. Z. Shi, S. Milasta, R. Carter, D. Finkelstein, L. L. McCormick, P. Fitzgerald, H. Chi, J. Munger, and D. R. Green, "The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation.," *Immunity*, vol. 35, pp. 871–82, Dec. 2011.
- [173] M. Bachmann and T. Möröy, "The serine/threonine kinase Pim-1.," *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 37, pp. 726–30, Apr. 2005.
- [174] G. A. Calin, M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S. E. Wojcik, M. V. Iorio, R. Visone, N. I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.-g. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, and C. M. Croce, "A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia.," *The New England journal of medicine*, vol. 353, pp. 1793–801, Oct. 2005.
- [175] G. Marcucci, K. Mrózek, M. D. Radmacher, R. Garzon, and C. D. Bloomfield, "The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia.," *Blood*, vol. 117, pp. 1121–9, Jan. 2011.
- [176] F. Ma, S. Xu, X. Liu, Q. Zhang, X. Xu, M. Liu, M. Hua, N. Li, H. Yao, and X. Cao, "The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-gamma.," *Nat Immunol*, vol. 12, no. 9, pp. 861–869.
- [177] H. Mueller, A. K. Detjen, S. D. Schuck, A. Gutschmidt, U. Wahn, K. Magdorf, S. H. E. Kaufmann, and M. Jacobsen, "Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+, IFNgamma+, and TNFalpha+ multifunctional memory T cells coexpress GM-CSF.," *Cytokine*, vol. 43, pp. 143–8, Aug. 2008.
- [178] Hong Xu, Irene Y Cheung, Hong-Fen Guo and N.-K. V. Cheung, "MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: Potential implications for immune based therapy of human solid tumors," *Cancer Research*, vol. 69, no. 15, pp. 6275–81, 2010.
- [179] a. I. Chapoval, J. Ni, J. S. Lau, R. a. Wilcox, D. B. Flies, D. Liu, H. Dong, G. L. Sica, G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen, "B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production.," *Nature immunology*, vol. 2, pp. 269–74, Mar. 2001.
- [180] C.-Z. Chen, L. Li, H. F. Lodish, and D. P. Bartel, "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 303, pp. 83–6, Jan. 2004.

- [181] W. Sun, W. Shen, S. Yang, F. Hu, H. Li, and T.-H. Zhu, "miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP- β ," *Cell research*, vol. 20, pp. 1158–69, Oct. 2010.
- [182] K. Makino, M. Jinnin, I. Kajihara, N. Honda, K. Sakai, S. Masuguchi, S. Fukushima, Y. Inoue, and H. Ihn, "Circulating miR-142-3p levels in patients with systemic sclerosis," *Clinical and experimental dermatology*, vol. 37, pp. 34–9, Jan. 2012.
- [183] S. Ding, Y. Liang, M. Zhao, G. Liang, H. Long, S. Zhao, Y. Wang, H. Yin, P. Zhang, Q. Zhang, and Q. Lu, "Decreased miR-142-3p/5p expression causes CD4(+) T cell activation and B cell hyperstimulation in systemic lupus erythematosus," *Arthritis and rheumatism*, pp. 1–35, May 2012.
- [184] C. E. Joyce, X. Zhou, J. Xia, C. Ryan, B. Thrash, A. Menter, W. Zhang, and A. M. Bowcock, "Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome," *Human molecular genetics*, vol. 20, pp. 4025–40, Oct. 2011.
- [185] F. Wang, X.-S. Wang, G.-H. Yang, P.-F. Zhai, Z. Xiao, L.-Y. Xia, L.-R. Chen, Y. Wang, X.-Z. Wang, L.-X. Bi, N. Liu, Y. Yu, D. Gao, B.-T. Huang, J. Wang, D.-B. Zhou, J.-N. Gong, H.-L. Zhao, X.-H. Bi, J. Yu, and J.-W. Zhang, "miR-29a and miR-142-3p downregulation and diagnostic implication in human acute myeloid leukemia," *Molecular biology reports*, vol. 39, pp. 2713–22, Mar. 2012.
- [186] M. Bellon, Y. Lepelletier, O. Hermine, and C. Nicot, "Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia," *Blood*, vol. 113, pp. 4914–7, May 2009.
- [187] C. Ramstad, V. Sundvold, H. K. Johansen, and T. Lea, "cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating ser-43 of raf-1 in the MAPK/ERK pathway," *Cellular signalling*, vol. 12, pp. 557–63, Aug. 2000.
- [188] H.-T. Jin, Y.-H. Jeong, H.-J. Park, and S.-J. Ha, "Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment," *BMB Reports*, vol. 44, pp. 217–231, Apr. 2011.
- [189] S. Schattling, "Charakterisierung der Immunantwort bei der Kindertuberkulose," *Dissertation*, 2012.
- [190] R. T. Gazzinelli, I. P. Oswald, S. L. James, and a. Sher, "IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 148, pp. 1792–6, Mar. 1992.
- [191] S. Redpath, P. Ghazal, and N. R. Gascoigne, "Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens," *Trends in microbiology*, vol. 9, pp. 86–92, Feb. 2001.

- [192] F. Gerosa, C. Nisii, S. Righetti, R. Micciolo, M. Marchesini, a. Cazzadori, and G. Trinchieri, "CD4(+) T cell clones producing both interferon-gamma and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients.," *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, vol. 92, pp. 224–34, Sept. 1999.
- [193] M. S. Song, L. Salmena, and P. P. Pandolfi, "The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor.," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 13, pp. 283–96, May 2012.
- [194] J. Li, "PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer," *Science*, vol. 275, pp. 1943–1947, Mar. 1997.
- [195] T. Maehama and J. E. Dixon, "The Tumor Suppressor, PTEN/ MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate," *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 22, pp. 13375–78, 1998.
- [196] Jodi L. Buckler, Xiaohe Liu and L. A. Turka, "Regulation of T-cell responses by PTEN," *Immunological reviews*, vol. 224, pp. 239–48, 2010.
- [197] K. Okkenhaug, A. Bilancio, G. Farjot, H. Priddle, S. Sancho, E. Peskett, W. Pearce, S. E. Meek, A. Salpekar, M. D. Waterfield, A. J. H. Smith, and B. Vanhaesebroeck, "Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 297, pp. 1031–4, Aug. 2002.
- [198] K. Okkenhaug, D. T. Patton, A. Bilancio, F. Garçon, W. C. Rowan, B. Vanhaesebroeck, and F. Garc, "The p110delta Isoform of Phosphoinositide 3-Kinase Controls Clonal Expansion and Differentiation of Th Cells," *The Journal of immunology*, vol. 177, no. 8, pp. 5122–28, 2012.
- [199] D. C. Palmer and N. P. Restifo, "Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function.," *Trends in immunology*, vol. 30, pp. 592–602, Dec. 2009.
- [200] W. S. Alexander, "Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 2, pp. 410–6, June 2002.
- [201] K. I. Masood, M. E. Rottenberg, B. Carow, N. Rao, M. Ashraf, R. Hussain, and Z. Hasan, "SOCS1 gene expression is increased in severe pulmonary tuberculosis.," *Scandinavian journal of immunology*, June 2012.
- [202] C. E. Egwuagu, C.-R. Yu, M. Zhang, R. M. Mahdi, S. J. Kim, and I. Gery, "Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 168, pp. 3181–7, Apr. 2002.

- [203] T. Naka, M. Fujimoto, and T. Kishimoto, "Negative regulation of cytokine signaling : STAT-induced STAT inhibitor Tetsuji Naka , Minoru Fujimoto and," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 24, no. 10, pp. 394–398, 1999.
- [204] B. Carow, X. Q. Ye, D. Gavier-Widén, S. Bhujra, W. Oehlmann, M. Singh, M. Sköld, L. Ignatowicz, A. Yoshimura, H. Wigzell, and M. E. Rottenberg, "Silencing suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) in macrophages improves Mycobacterium tuberculosis control in an interferon-gamma (IFN-gamma)-dependent manner.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, pp. 26873–87, July 2011.
- [205] U. Sester, M. Fousse, J. Dirks, U. Mack, A. Prasse, M. Singh, A. Lalvani, and M. Sester, "Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active states.," *PloS one*, vol. 6, p. e17813, Jan. 2011.
- [206] F. Bazzoni, M. Rossato, M. Fabbri, D. Gaudiosi, M. Mirolo, L. Mori, N. Tamassia, A. Mantovani, M. a. Cassatella, and M. Locati, "Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals.," *PNAS*, vol. 106, pp. 5282–7, Mar. 2009.
- [207] J. D. Allen and a. Berns, "Complementation tagging of cooperating oncogenes in knock-out mice.," *Seminars in cancer biology*, vol. 7, pp. 299–306, Oct. 1996.
- [208] M. Bachmann, C. Kosan, P. X. Xing, M. Montenarh, I. Hoffmann, and T. Möröy, "The oncogenic serine / threonine kinase Pim-1 directly phosphorylates and activates the G2/M specific phosphatase Cdc25C.," *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 38, pp. 430–43, Mar. 2006.
- [209] T. L. T. Aho, J. Sandholm, K. J. Peltola, H. P. Mankonen, M. Lilly, and P. J. Koskinen, "Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site.," *FEBS letters*, vol. 571, pp. 43–9, July 2004.
- [210] H. Wu, J. R. Neilson, P. Kumar, M. Manocha, P. Shankar, P. a. Sharp, and N. Manjunath, "miRNA profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells.," *PloS one*, vol. 2, p. e1020, Jan. 2007.
- [211] R. L. Rossi, G. Rossetti, L. Wenandy, S. Curti, A. Ripamonti, R. J. P. Bonnal, R. S. Birolo, M. Moro, M. C. Crosti, P. Gruarin, S. Maglie, F. Marabita, D. Mascheroni, V. Parente, M. Comelli, E. Trabucchi, R. De Francesco, J. Geginat, S. Abrignani, and M. Pagani, "Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4+ T cells by the microRNA miR-125b.," *Nature immunology*, vol. 12, pp. 796–803, Aug. 2011.

- [212] A. Banerjee, F. Schambach, C. S. DeJong, S. M. Hammond, and S. L. Reiner, "MicroRNA-155 inhibits IFN-gamma signaling in CD4+ T cells.," *European journal of immunology*, vol. 40, pp. 225–31, Jan. 2010.
- [213] F. Novelli, P. Bernabei, L. Ozrnen, L. Rigamonti, A. Allione, S. Pestka, and G. Gianni, "Switching on of the proliferation or apoptosis of activated human T lymphocytes by IFN-g is correlated with the differential expression of the a- and b-chains of its receptor.," *The Journal of immunology*, vol. 157, no. 5, pp. 1935–43, 1996.
- [214] B. R. Manetti, P. Parronchi, M. G. Giudizi, M.-p. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, and P. Sergio, "Natural Killer Cell Stimulatory Factor (Interleukin 12 [11,12]) Induces T Helper Type 1 (Th1)-specific Immune Responses and Inhibits the Development of ID4-producing Th Cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 177, no. 4, pp. 1199–204, 1993.
- [215] E. Maggi, P. Parronchi, R. Manetti, C. Simonelli, M. P. Piccinni, F. S. Rugiu, M. De Carli, M. Ricci, and S. Romagnani, "Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 148, pp. 2142–7, Apr. 1992.
- [216] P. Parronchi, M. De Carli, R. Manetti, C. Simonelli, S. Sampognaro, M. P. Piccinni, D. Macchia, E. Maggi, G. Del Prete, and S. Romagnani, "IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 149, pp. 2977–83, Nov. 1992.
- [217] R. Sarkar, L. Lenders, K. a. Wilkinson, R. J. Wilkinson, and M. P. Nicol, "Modern Lineages of Mycobacterium tuberculosis Exhibit Lineage-Specific Patterns of Growth and Cytokine Induction in Human Monocyte-Derived Macrophages.," *PloS one*, vol. 7, p. e43170, Jan. 2012.