

**Transmission von microRNA antimiRs auf Mausjungtiere über die  
maternal-plazentar-fetale Einheit**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hönig, Jonas  
aus Hannover

Gießen 2022

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim

Gutachter: Prof. Dr. Seeger

Gutachter: PD Dr. Troidl

Tag der Disputation: 04.05.2023

# I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	I
II	Abbildungsverzeichnis.....	IV
III	Tabellenverzeichnis.....	V
IV	Abkürzungsverzeichnis .....	VI
V	Zusammenfassung.....	VIII
VI	Summary.....	IX
1	EINLEITUNG.....	1
1.1	microRNAs.....	1
1.1.1	Synthese und Funktion.....	1
1.1.2	microRNA-29 .....	4
1.2	Modulation der Gen- oder microRNA-Expression.....	5
1.2.1	Das <i>Cre-loxP</i> System.....	5
1.2.1	Tetracyclin (Tet-) basierte Systeme.....	6
1.2.2	antimicroRNAs .....	7
2	ZIELSETZUNG .....	9
3	MATERIAL UND METHODEN .....	10
3.1	Material .....	10
3.1.1	Tierversuche .....	10
3.1.2	Zelllinie.....	10
3.1.3	Maschinen und Equipment.....	10
3.1.4	Reagenzien.....	11
3.1.5	Kits.....	16
3.1.6	Antikörper.....	16
3.1.7	Primer .....	16
3.1.8	Synthetische microRNAs und antimicroRNAs .....	17
3.1.9	<i>In-Situ</i> Hybridisierung.....	18

3.2	Methoden .....	18
3.2.1	<i>In vivo</i> Untersuchungen.....	18
3.2.2	<i>In vitro</i> Untersuchungen .....	20
3.2.3	Genexpressionsanalyse .....	22
3.2.4	Analyse der Proteinexpression.....	28
3.2.5	Stem-Loop real-time RT-PCR .....	31
3.2.6	<i>In-Situ</i> Hybridisierung.....	32
3.2.7	RNA-Sequenzierung .....	32
3.2.8	<i>In silico</i> Analyse .....	33
3.2.9	Statistische Analyse .....	34
4	ERGEBNISSE.....	35
4.1	<i>In vivo</i> Applikation von antimir-29a-3p führt zu verminderter miR-29a-3p Expression in allen untersuchten Organen .....	35
4.2	Der Effekt von antimir-29a-3p auf die miR-29a-3p Expression bleibt auch zwei Wochen nach Applikation erhalten .....	37
4.3	Effekt von antimir-29a-3p auf die Expression von miR-29a-5p, miR-29b-3p und miR-29c-3p.....	39
4.4	Maternale Applikation von antimir-29a-3p verringert die Expression von miR-29a-3p auch bei den neugeborenen Jungtieren .....	40
4.4.1	Jungtiere .....	41
4.4.2	Muttertiere.....	44
4.5	Antimir-Nachweis in Gewebe mittels stem-loop RT-PCR und <i>In-Situ</i> Hybridisierung .....	46
4.6	Effekte auf weitere microRNAs und Vergleich der Geburtsgewichte.....	49
4.7	Inkubation von NIH/3T3 Fibroblasten mit antimir-29a-3p oder einem miR-29a-3p mimic <i>in vitro</i> .....	53
4.8	Validierung von <i>Eln</i> und <i>Adams7</i> als Ziele von miR-29a-3p .....	54
4.9	Antimir-29a-3p erhöht bei maternaler Applikation <i>in vivo</i> die Expression der miR-29a-3p Ziele auch beim Nachwuchs .....	57
5	DISKUSSION .....	59
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	68

7	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....	77
8	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....	78
9	DANKSAGUNG.....	79

## II      **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der microRNA Prozessierung .....	2
Abbildung 2:	Sequenzen der microRNA-29 Familie .....	4
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der zeitlichen Versuchsabläufe.....	18
Abbildung 4:	Effekt einer direkten antimiR-29a-3p Injektion auf die miR-29a-3p Expression in verschiedenen Organen.....	36
Abbildung 5:	Vergleich des Effektes einer direkten antimiR-29a-3p Injektion auf die miR-29a-3p Expression an P7 und P14.....	38
Abbildung 6:	Nebeneffekt der antimiR-29a-3p Applikation auf die Expression weiterer miR-29 Familienmitglieder .....	40
Abbildung 7:	Effekt einer maternalen antimiR-29a-3p Applikation auf die miR-29a-3p Expression der Mausjungen in verschiedenen Organen... ..	43
Abbildung 8:	Expression von miR-29a-3p in verschiedenen Organen von mit antimiR-29a-3p behandelten Muttertieren .....	45
Abbildung 9:	AntimiR-29a-3p Detektion mittels stem-loop qRT-PCR in ausgewählten Organen von mit antimiR-29a-3p behandelten Mausjungen .....	47
Abbildung 10:	Detektion von antimiR-29a-3p in ausgewählten Organen mittels <i>In-Situ</i> Hybridisierung.....	48
Abbildung 11:	Nebeneffekte auf andere microRNAs durch antimiR-29a-3p Applikation.....	50
Abbildung 12:	Einfluss der antimiR-29a-3p Behandlung auf das postnatale Wachstum der Mausjungen.....	52
Abbildung 13:	Anwendung eines synthetischen miR-29a-3p mimic und von antimiR-29a-3p <i>in vitro</i> .....	53
Abbildung 14:	<i>In vitro</i> Validierung von <i>Eln</i> und <i>Adamts7</i> als Zielgene von miR-29a-3p in NIH/3T3 Fibroblasten.....	56
Abbildung 15:	Maternale Transmission von antimiR-29a-3p auf Mausjungtiere führt zu vermehrter Expression der miR-29a-3p Zielgene in den Jungtieren .....	58

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Master Mix für cDNA Synthese aus mRNA bzw. microRNA.....	13
Tabelle 2: Master Mix für mRNA- bzw. microRNA-qRT-PCR.....	13
Tabelle 3: Verwendete Pufferlösungen.....	14
Tabelle 4: Verwendete Gele .....	15
Tabelle 5: Verwendete Kits.....	16
Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper.....	16
Tabelle 7: Verwendete Primer .....	17
Tabelle 8: Synthetische microRNAs und antimicroRNAs .....	17
Tabelle 9: Sonden für die <i>In-Situ</i> Hybridisierung.....	18
Tabelle 10: Master Mix für die cDNA Synthese aus mRNA .....	24
Tabelle 11: Thermozyklen Programmierung für cDNA Synthese aus mRNA .....	24
Tabelle 12: Master Mix für die cDNA Synthese aus microRNA.....	25
Tabelle 13: Thermozyklen Programmierung für cDNA Synthese aus microRNA .....	25
Tabelle 14: Master Mix für die mRNA-qRT-PCR.....	26
Tabelle 15: Thermozyklen Programmierung für mRNA-qRT-PCR .....	26
Tabelle 16: Master Mix für die microRNA-qRT-PCR.....	27
Tabelle 17: Thermozyklen Programmierung für microRNA-qRT-PCR .....	28
Tabelle 18: Auszug aus der targetscan Online Datenbank für miR-29a-3p.....	54

## IV Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Ampere
ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
Ant.	antimiR (Anti-microRNA)
antimiR	Anti-microRNA
APS	Ammonium Persulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct	Cycle threshold
DGCR-8	DiGeorge Critical Region 8 Protein
D-MEM	Dublecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	embryonal
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELN	Elastin
FBS	Fetales Rinderserum
FDR	False Discovery Rate
g	Gramm
He	Herz
Hi	Hirn
IgG	Immunglobulin-G
IP / i.p.	intraperitoneal
IV / i.v.	intravenös
kDa	Kilo Dalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
Le	Leber
LNA	Locked Nucleic Acid
Lu	Lunge

mg	Milligramm
min	Minute
miR	microRNA
ml	Milliliter
MLI	Mean Linear Intercept
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MuLV	Murines Leukämievirus
<i>n</i>	Anzahl
Ni	Niere
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
P	Postnataler Tag
<i>P</i> Wert	Wahrscheinlichkeitswert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
POL	Polymerase
PP	Postpartal
Ref	Referenz
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
(q)RT-PCR	(Quantitative) Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunden
Scr.	scrambled
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TLC	Total Lung Capacity
Tris/TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt

## V Zusammenfassung

MicroRNAs spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse, sind aber auch entscheidender Mediator von Entwicklungs- und Wachstumsvorgängen von Organen und Geweben. Die Beeinflussung der pränatalen microRNA Expression und somit der Organogenese mittels Tamoxifen oder Tetracyclin abhängiger Genmodulationssysteme ist zwar bereits vielfach angewandt worden, bringt allerdings durch zahlreiche unkalkulierbare Nebenwirkungen auch Nachteile mit sich.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob mittels pränataler Verabreichung einer spezifischen antimicroRNA an schwangere Mäuse die Expression der Ziel-microRNA und ihrer entsprechenden Zielgene auch in den Nachkommen beeinflusst werden können. Beispielhaft wurde hier die microRNA-29a-3p ausgewählt. Mittels stem-loop PCR und *In-Situ* Hybridisierung konnte antimiR-29a-3p im Gewebe der Jungtiere nach maternaler Applikation nachgewiesen werden, eine Überwindung der fetoplazentaren Schranke ist also möglich.

Die antimiR-29a-3p ließ sich im Gewebe der Jungtiere nicht nur nachweisen, es konnte auch eine Reduktion der microRNA-29a-3p Expression in Herz, Hirn-, Leber-, Lungen-, und Nierengewebe der Jungtiere festgestellt werden. Hierzu waren zwar höhere Dosen der antimicroRNA verglichen mit der direkten Injektion nötig, dann waren die Effekte aber vergleichbar stark ausgeprägt. Anders als bei direkter antimicroRNA-Verabreichung konnte mit dieser Methodik auch ein Effekt auf die microRNA Expression bereits am Tag der Geburt in allen untersuchten Organen erzielt werden.

*In vitro* konnten nachfolgend an NIH/3T3 Fibroblasten *Eln* mRNA (kodiert Elastin, ELN) und *Adamts7* mRNA (kodiert A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS7) als Ziele der microRNA-29a-3p identifiziert werden. Für *Eln* zeigte sich in mit synthetischer miR-29a-3p behandelten Fibroblasten eine verminderte Proteinexpression ohne signifikant veränderte mRNA Expression. Für *Adamts7* waren sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene verminderte Expressionen nachweisbar. Diese Ergebnisse konnten mit Lebergewebe von Mausjungtieren, deren Mütter zuvor eine antimiR-29a-3p Injektion erhalten hatten, repliziert werden.

Maternal applizierte antimiR-29a-3p gelangt somit nicht nur durch die fetoplazentare Schranke in die Organgewebe der Jungtiere, sondern sorgt auch für eine Reduktion der microRNA-29a-3p Expression mit konsekutiv erhöhter Expression der Zielgene dieser microRNA.

## VI Summary

MicroRNAs play an important role in the regulation of cellular processes and are key mediators of development and growth of organs and tissues. Modulating prenatal microRNA expression and thus organogenesis using tamoxifen or tetracyclin dependant systems is well established, but also comes with side effects and methodical drawbacks.

The aim of this study was to investigate if it is possible to modulate microRNA- and their respective target gene expression in mouse offspring by administering an antimicroRNA to the pregnant mouse dam. MicroRNA-29a-3p was picked exemplary for this study. AntimiR-29a-3p was detected in tissue harvested from mouse pups using stem-loop RT-PCR and *In-Situ* hybridization, thus passaging the fetoplacental barrier is possible.

Additional to antimiR-29a-3p detection in mouse pup tissue, down regulation of microRNA-29a-3p expression was observed in heart, brain, liver, lung and kidney tissue. Using higher doses of the antimicroRNA, the effect on miR-29a-3p expression was comparable to a direct injection of the antimicroRNA to the mouse pups. With the maternal administration, down regulation of the microRNA was achieved already on the day of birth in all tested organs.

*In vitro* experiments with NIH/3T3 fibroblasts verified *Eln* mRNA (encoding elastin, ELN) and *Adamts7* mRNA (encoding A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS7) as targets of microRNA-29a-3p. MiR-29a-3p treated fibroblasts showed a downregulation of ELN protein levels, while no significant effect was noted on the *Eln* mRNA. For *Adamts7* changes on mRNA and protein levels were observed. These results were later reproduced in liver tissue of mouse pups from antimicroRNA treated dams.

Maternally administered antimiR-29a-3p is able to pass the fetoplacental barrier and reduce microRNA-29a-3p expression in mouse offspring with a consecutive upregulation of the microRNA target genes.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 microRNAs

MicroRNAs (miRs) sind eine relativ neue Untergruppe der Ribonukleinsäuren (RNAs) mit einer Länge von ~22 Nukleotiden [5]. Die Entdeckung der ersten microRNA *lin-4* in Fadenwürmern gelang 1993 [57], als festgestellt wurde, dass dieses Gen kein Protein, sondern eine kurze RNA kodiert [105]. Kurz darauf konnte gezeigt werden, dass *lin-4* durch die microRNA *lin-14* reguliert wird [108], sodass den microRNAs bereits damals eine regulatorische Funktion zugeordnet wurde. Mittlerweile sind über 1.500 microRNAs bekannt [46], deren Anteil circa 1 % am gesamten Genom des Menschen ausmacht und denen Einflüsse auf circa 30 % aller Gene zugeschrieben werden [43, 68].

### 1.1.1 Synthese und Funktion

Die für microRNAs kodierenden Gene werden meist von der RNA Polymerase II, in Ausnahmefällen von der RNA Polymerase III, transkribiert [43, 105]. Die Transkriptionsprodukte sind sogenannte pri-microRNAs, die noch im Zellkern von einem Komplex aus der Ribonuklease Drosha (Ribonuklease Typ III) in Verbindung mit DGCR-8 (DiGeorge Critical Region 8 Protein) geschnitten werden [109]. Die entstandenen pre-microRNAs sind 60-70 Nukleotide lang und weisen eine Haarnadelstruktur auf. Ein Ende der späteren microRNA wird dabei durch den Drosha/DGCR-8 Schnitt definiert [105].

Die weitere Prozessierung zur fertigen microRNA geschieht im Zytoplasma. Der Transport der pre-microRNAs dorthin erfolgt durch Exportin-5. Die Bindung an dieses Protein ist nur für pre-microRNAs einer bestimmten Länge und Struktur möglich, sodass zuvor inkorrekt prozessierte Vorläufer nicht ins Zytoplasma exportiert werden [109].

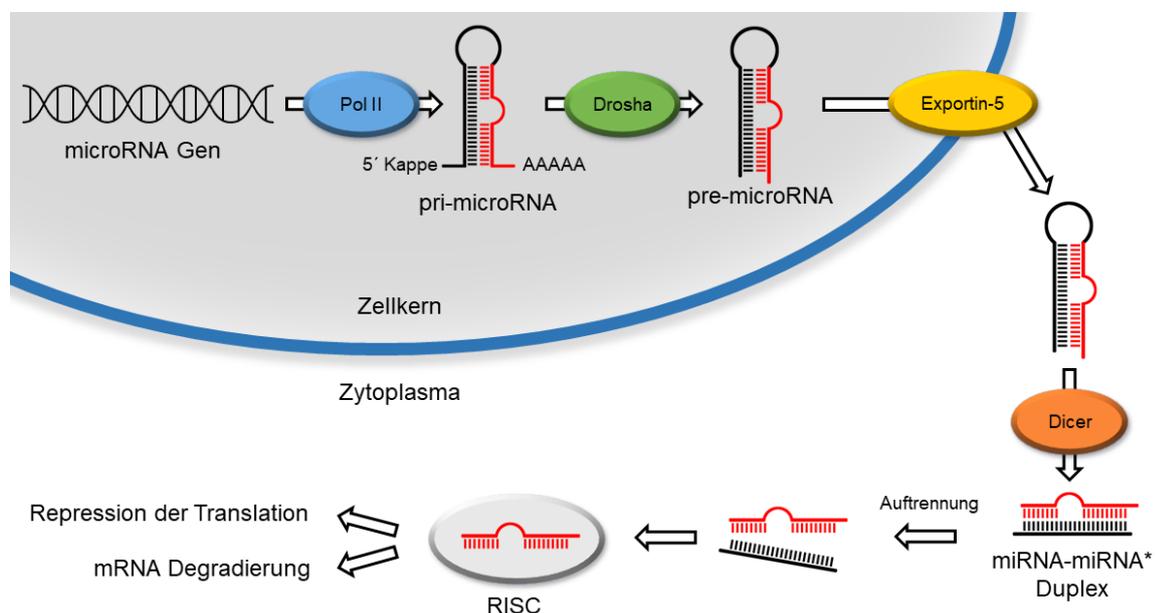
Im Zytoplasma werden die pre-microRNAs durch die Ribonuklease III Dicer erneut geschnitten. Dieser Schnitt erfolgt ~22 Nukleotide vom ersten Schnitt durch Drosha entfernt, sodass nun die vollendete microRNA Duplex entsteht [105, 109].

Die Interaktion der microRNAs mit messenger-RNAs (mRNAs) erfolgt in Form eines RNA induced silencing complex (RISC). An der Entstehung dieses Komplexes ist

wiederum der RISC loading complex bestehend aus der Ribonuklease Dicer, Argonaute 2 und weiteren Proteinen beteiligt [109].

Für die Inkorporierung in den RNA induced silencing complex (RISC) muss die microRNA Duplex aufgetrennt werden. Hierbei ist unter anderem die thermodynamische Stabilität der beiden Stränge wichtig [109]. In der Regel wird der weniger stabile Strang (guide strand) in den RISC aufgenommen, der andere Strang (passenger strand) wird degradiert [105].

Der RNA induced silencing complex gelangt nachfolgend zur Ziel mRNA und inaktiviert diese durch Repression der Translation oder eine Degradierung der mRNA [105].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der microRNA Prozessierung.** Die für microRNAs kodierenden Gene werden durch die RNA Polymerase II zu pri-microRNAs transkribiert und durch die Ribonuklease Drosha geschnitten, wodurch sogenannte pre-microRNAs entstehen. Diese werden in das Zytoplasma exportiert und dort durch die Ribonuklease Dicer erneut geschnitten. Das Produkt ist eine microRNA Duplex, die sich in ihre zwei Stränge aufteilt, wobei ein Strang (guide strand) in den RNA induced silencing complex (RISC) aufgenommen wird. Dieser gelangt zu den Ziel mRNA und führt dort zu einem Schneiden oder einer Repression der Translation der entsprechenden mRNA.

Besteht eine hohe Komplementarität zwischen microRNA und mRNA wird diese eher degradiert [90, 105], andernfalls erfolgt die Repression der Translation durch Inhibierung der Initiation oder Elongation. Wie die translationale Repression genau abläuft und in

welchen Fällen es genau zur Degradierung der mRNA kommt, ist bisher nicht abschließend geklärt [105].

Sicher ist hingegen, dass die sogenannte „Seed Region“ eine wichtige Rolle bei der Bindung der Ziel mRNA spielt. Dabei handelt es sich um die Basen 2-8 vom 5' Ende der microRNA gezählt. Bei dem Versuch, Vorhersagen über Ziel-mRNA der jeweiligen microRNA anhand der Komplementarität zu machen, konnte gezeigt werden, dass eine Übereinstimmung im Bereich der Seed Region zwischen messenger- und microRNA die Anzahl falsch-positiver Vorhersagen deutlich reduziert. Passend dazu war bereits bekannt, dass das 5' Ende verwandter microRNAs deutlich besser konserviert ist, als das 3' Ende [6, 11, 49, 59, 60, 90]. Mithilfe dieser Erkenntnisse sind bioinformatische Datenbanken wie „targetscan“, „Diana microT“ und „miRBase“ erstellt worden, in denen mögliche Ziel mRNAs der jeweiligen microRNAs unter anderem anhand der Komplementarität innerhalb der Seed Region vorhergesagt werden sollen [1, 34, 65].

Seit der Entdeckung der microRNAs und dem regulatorischen Zusammenspiel zwischen *lin-4* und *lin-14* in Fadenwürmern wurde von einer regulatorischen Rolle der microRNAs ausgegangen [57, 105, 108].

Die genauere Untersuchung der Funktion dieser neuen Klasse von RNAs begann allerdings zunächst in Pflanzen, dort weisen deutlich mehr microRNAs eine annähernd perfekte Komplementarität zu ihren jeweiligen Ziel-mRNAs auf als bei Tieren. Somit ist die Vorhersage möglicher Ziel-mRNAs und damit auch die Funktion der microRNAs deutlich vereinfacht. Es konnte gezeigt werden, dass die microRNAs zum großen Teil Transkriptionsfaktoren als Zielstrukturen haben, sodass die Annahme einer regulatorischen Funktion gefestigt wurde [4, 5, 83].

Auch bei Tieren wurde daher eine ähnliche Aufgabe der microRNAs angenommen, da hier aber insgesamt eine deutliche geringere Komplementarität zwischen microRNA und Ziel-mRNA besteht, fällt der Nachweis dieser Hypothese im Vergleich zur Pflanzenwelt schwerer [5].

Mittlerweile konnten microRNAs in zahlreichen Studien auch bei Tieren regulatorische Einflüsse auf verschiedenste zelluläre Prozesse wie Fettmetabolismus, Zelltod, Differenzierung von Stammzellen, neuronale Entwicklung und die Entstehung von Tumoren nachgewiesen werden [20, 37, 43, 95, 105, 107], sodass nach Entdeckung und Untersuchung der Bedeutung von microRNAs auch die therapeutische Nutzung dieser Klasse von RNAs Gegenstand aktueller Forschung ist. Oftmals geht es dabei um die

Entwicklung von Tumortherapien, aber auch um zum Beispiel Therapien gegen Hepatitis oder Tuberkulose [18, 41, 44, 45, 89, 97].

### 1.1.2 microRNA-29

Die microRNA-29a wurde erstmals 2001 in menschlichen Epithelzellen (HeLa Zellen) nachgewiesen [54]. Kurze Zeit später wurden zwei weitere Mitglieder der microRNA-29 Familie entdeckt: miR-29b und miR-29c [21, 55]. Die Familie besteht also aus microRNA-29a, microRNA-29b und microRNA-29c, wobei von microRNA-29b zwei Unterformen (microRNA-29b-1 und microRNA-29b-2) existieren [106].

<b>miR-29a-3p spezifische anti-miR</b>	<b>TCGTGGTAGACTTTAG</b>
hsa, rno, mmu-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
hsa, rno, mmu-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
hsa, rno, mmu-miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
	Seed Region

**Abbildung 2: Sequenzen der microRNA-29 Familie.** Die microRNAs -29a-3p, -29b-3p und -29c-3p sind 22 (a und c) bzw. 23 (b) Nukleotide lang und haben alle die gleiche Seed Sequenz. Unterschiede in der Nukleotidfolge sind mit leeren Buchstaben gekennzeichnet. Die verwendete anti-miR-29a-3p ist komplementär zur Seed Sequenz der miRs-29 und hat somit Wirkung auf alle drei Familienmitglieder. Die Buchstaben stehen für die Nukleotide Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T) und Uracil (U). Die Abkürzungen hsa (*Homo sapiens*), rno (*Rattus norvegicus*) und mmu (*Mus musculus*) stehen für die jeweiligen Spezies.

Für alle Mitglieder der Familie konnte gezeigt werden, dass sie unter anderem vermehrt in Fibroblasten exprimiert werden [104], sodass ihnen eine Rolle in der Regulation fibrotischer Umbauprozesse zugeschrieben wird [19]. So konnte bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie eine erhöhte Expression von miR-29a im Blutplasma gemessen werden [35, 88]. Nach einem Myokardinfarkt zeigte sich in der fibroblastenreichen und fibrotisch umgebauten Grenzzone des Infarktareals eine verminderte Expression der miRs-29 [29, 104]. Im Mausmodell konnte nach Inhibierung von miR-29b mit antimicroRNAs eine Induktion der Kollagensynthese nachgewiesen werden, sodass von einer fibrotischen Wirkung durch eine verminderte miR-29b Expression ausgegangen wird [104].

Umgekehrt zeigten sich bei pathologischen Umbauprozessen des Bindegewebes im Rahmen von Leber-, Lungen-, Nierenfibrose und systemischer Sklerose verminderte Expressionen der microRNA-29 Familienmitglieder [16, 64, 66, 81, 85], sodass diese Familie insgesamt eine Schlüsselrolle bei fibrotischen Erkrankungen zu spielen scheint.

Darüber hinaus wurden aberrante Expressionen von miR-29 Mitgliedern im Zusammenhang onkologischer Erkrankungen, wie beispielsweise dem Magenkarzinom und der akuten lymphatischen Leukämie gefunden [102, 106, 113]. Ebenfalls scheint miR-29a ein Marker für die Schwere eines akuten Nierenversagens zu sein [2]. Dies veranschaulicht die zahlreichen Funktionen einzelner microRNAs in verschiedensten funktionellen Bereichen unter anderem aufgrund ihrer Vielzahl von beeinflussten Genen.

Für die vorliegende methodische Arbeit wurde microRNA-29a-3p ausgewählt, da bereits gezeigt werden konnte, dass miR-29a-3p knock-out Mäuse lebensfähig sind und keine wesentlichen Veränderungen in der Entwicklung oder der Struktur wichtiger Organgewebe aufweisen [78]. Somit war mit wenigen schwerwiegenden oder letalen Nebenwirkungen der antimiR-29a-3p Verabreichung zu rechnen.

## 1.2 Modulation der Gen- oder microRNA-Expression

Zur Untersuchung der Funktion einzelner Gene im Allgemeinen oder microRNAs im Speziellen, ist es essenziell, die Expression dieser Gene bzw. letztlich der microRNAs zu einem definierten Zeitpunkt spezifisch und langwirksam ausschalten zu können. Hierzu haben sich einige allgemeine Ansätze etabliert, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

### 1.2.1 Das *Cre-loxP* System

Bereits 1980 wurde das sogenannte *Cre-loxP* System erstmals von Sternberg und Hamilton beschrieben [101], in den Folgejahren weiterentwickelt und 1988 im Tiermodell zur Anwendung gebracht [93, 94].

*Cre* ist eine Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1, welche in der Lage ist Abschnitte aus der DNA herauszuschneiden. *LoxP* ist die Erkennungssequenz für *Cre* und flankiert

die zu entfernende DNA-Sequenz [56], es werden also zwei Tier- oder Zellgruppen benötigt. Eine trägt die Rekombinase *Cre*, die andere enthält die beiden *LoxP* Sequenzen, die das zu untersuchende Gen umgeben. Ein Teil der Nachkommen beider Gruppen trägt dann die *Cre* und die *LoxP* Sequenz, sodass bei ihnen die Rekombinase gebildet wird und mit der *LoxP* Sequenz interagieren kann. Je nach Lokalisation und Ausrichtung der *LoxP* Sequenz kommt es in der Folge zur Insertion, Deletion oder Translokation des Zielgens [82, 96]. Ein Vorteil dieses Systems ist, dass keine weiteren Cofaktoren benötigt werden [72].

Um die Aktivierung dieses Prozesses zeitlich steuern zu können, können *Cre* Fusionsproteine genutzt werden. Meist kommt hierbei ein Steroidhormonrezeptor (Östrogenrezeptor) zum Einsatz, der mit der Rekombinase fusioniert wird. Das Fusionsprotein heißt *CreER* (ER von Estrogen receptor). Nach Zugabe des synthetischen Steroids Tamoxifen zum gewünschten Zeitpunkt bindet dies an *CreER* und führt zur Überführung des Komplexes aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wo dann die Interaktion mit den *LoxP* Sequenzen stattfindet [28, 36, 42, 82, 91].

### 1.2.1 Tetracyclin (Tet-) basierte Systeme

Ein weit verbreiteter Ansatz zur Beeinflussung der Expression bestimmter Gene basiert auf dem „Tet expression system“ und wurde bereits 1992 erstmals von Gossen und Bujard beschrieben [32]. Tet steht dabei für Tetracyclin und stellt den Schalter zur Aktivierung in diesem System dar. Weitere Komponenten des Systems sind der Tetracycline controlled transactivator (tTa), bestehend aus dem Tet-Repressor (TetR) und einer Aktivierungsdomäne (VP-16 aus Herpes-simplex Viren), sowie ein zweites Plasmid, das für das gewünschte Gen kodiert und unter Kontrolle des Tet Responsive Element (TRE) steht. Für die Arbeit mit Zelllinien müssen beide Plasmide in die Zellen transferiert werden, bei Tierversuchen bedarf es zweier transgener Versuchsgruppen, jeweils eine trägt das tTa bzw. das TRE, durch Kreuzung beider Gruppen wird das Tet-System in der Nachfolgeneration komplettiert und somit funktionsfähig.

Für das Tet-System gibt es eine Tet-On und eine Tet-Off Variante. In der Tet-Off Variante fungiert die Zugabe von Tetracyclin als Schalter zur Deaktivierung: tTa bindet an das TRE, was zur Ablesung des gewünschten Gens führt. Nach Zugabe von Tetracyclin entsteht ein Tetracyclin-tTa Komplex, der nicht mehr an das TRE binden kann und die Transkription somit verhindert.

Das Tet-On System enthält statt tTa ein reverse tTa (rtTa) und statt Tetracyclin, dessen Derivat Doxycyclin (Dox). Hier verhält es sich nun genau umgekehrt. Nur in Anwesenheit von Dox bindet der rtTa das TRE und führt somit zur Transkription des Zielgens [17, 32, 33, 48, 67, 70, 82].

## 1.2.2 antimicroRNAs

Speziell für den Bereich der microRNA Erforschung haben sich sogenannte antimiRs (antimicroRNAs) etabliert, die die Expression der zugehörigen microRNA spezifisch hemmen können. Die antimiR trägt dann den Namen der jeweiligen microRNA z.B. microRNA-29a-3p und antimiR-29a-3p.

AntimiRs sind chemisch modifizierte Oligonukleotide, die eine teilweise oder komplette Komplementarität zur Ziel-microRNA aufweisen [68]. Die Inaktivierung der Ziel-microRNA geschieht dabei durch sterische Bindung oder Hybridisierung der antimiR mit der microRNA [58]. Erstmals wurden antimiRs 2005 *in vivo* angewandt [50, 51], seitdem sind verschiedene chemische Modifikationen der Oligonukleotide entwickelt worden, um die Stabilität der antimiRs zu verbessern. Neben der Veränderung des Zuckeranteils der antimiR mit einer 2'-O-Methyl-, 2'-O-Methoxyethyl- oder 2'-O-Fluorgruppe kommen auch verbrückte Nukleinsäuren (locked nucleic acids, kurz LNA) zum Einsatz. Die genannten Modifikationen dienen vor allem der verbesserten Nuklease Resistenz, LNA antimiRs weisen zudem die höchste Affinität zur Ziel-microRNA auf [7, 29, 68, 100]. AntimiRs zeigen sich hierbei hoch spezifisch für die Ziel-microRNA mit einem inhibitorischen Effekt der auch mehrere Wochen nach Verabreichung noch nachweisbar ist [50, 51, 75, 104]. Ein weiterer wichtiger Faktor sind mögliche Nebeneffekte der antimiR Applikation. Hier konnten in Versuchen auch bei hohen Dosen keine toxischen Wirkungen der antimiRs in Mäusen und Affen gefunden werden [25, 29], was vermutlich auf die hohe Spezifität der antimiRs und somit geringe Nebenwirkungen zurückzuführen ist. AntimiRs scheinen somit insgesamt geeignet für eine spezifische, langlebige und nebenwirkungsarme Inhibition von microRNAs zu sein.

In Tierversuchen konnten bereits therapeutische Effekte der antimiRs genutzt werden. So konnte eine Neuroprotektion durch miR-181a Inhibition nach einem Schlaganfall bei Mäusen [110] und eine funktionelle Verbesserung der Motorik nach Rückenmarksverletzung durch antimiR-223 bei Ratten nachgewiesen werden [61]. Die Inhibition von miR-17 und -20a wirkten sich therapeutisch positiv in Modellen der

pulmonalen Hypertonie aus [12, 80] und antimiR-155 könnte die pulmonale Inflammation bei Lupus erythematodes mildern [114]. Eine Inhibition von miR-23b durch eine entsprechende antimiR fördert die Gallengangsentwicklung in Mäusen und kann eine durch TGF- $\beta$  induzierte Leberfibrose blockieren [87]. Dies sind nur einige Beispiele erfolgreicher Anwendungen von antimiRs, die aber die Wichtigkeit und Vielfältigkeit dieser auch therapeutisch nutzbaren Substanzklasse verdeutlichen.

## 2 ZIELSETZUNG

MicroRNAs als wichtige Mediatoren verschiedenster Entwicklungsabläufe spielen im Verständnis und mittlerweile auch in der Behandlung zahlreicher pathologischer Prozesse eine wichtige Rolle. Ihre Funktion kann spezifisch und zeitlich steuerbar durch antimiRs gehemmt werden. Für Prozesse in der pränatalen und frühen postnatalen Phase schieden antimiRs aber bisher aus, da diese den Jungtieren direkt injiziert werden müssen und somit die microRNA Expression innerhalb dieser Zeiträume bisher nicht mittels antimiRs beeinflussbar war. Hier kamen stattdessen konventionelle Genmodulationsansätze zum Tragen, deren Induktionssubstanzen aber mit Nebenwirkungen auf Wachstumsvorgänge nur bedingt zur Untersuchung selbiger geeignet sind.

Diese Überlegungen haben zur Durchführung der vorliegenden Arbeit und der Hypothese geführt, dass durch maternale Applikation einer antimiR auch die microRNA Expression der heranwachsenden Jungtiere in der pränatalen und frühen postnatalen Phase modulierbar wäre.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war:

- 1) Die Klärung der Frage, ob bei Mäusen maternal applizierte antimiR-29a-3p die Blut-Plazenta-Schranke überwinden und somit einen Effekt auf die miR-29a-3p Expression der Jungtiere haben kann.
- 2) Zu untersuchen, wie stark dieser Effekt in verschiedenen Organgeweben und im Vergleich zur direkten Injektion der antimiR ausgeprägt ist.
- 3) Eine mögliche Beeinflussung des Effektes durch unterschiedliche Applikationswege der antimiR zu untersuchen.
- 4) Ziele der miR-29a-3p zunächst *in vitro* zu validieren und die Expression selbiger in maternal mit antimR-29a-3p behandelten Mausjungtieren zu untersuchen.
- 5) Mögliche Nebeneffekte einer antimiR-29a-3p Administration auf das allgemeine Wachstum der Versuchstiere, aber auch andere als die Ziel-microRNA zu beleuchten.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Tierversuche

Alle Tierexperimente wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (Genehmigungsnummer B2/1051 und B2/1108). Es wurden C57BL/6J Mäuse (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld) verwendet.

#### 3.1.2 Zelllinie

Es wurden NIH/3T3 mouse fibroblast-like Zellen aus der Zelllinie CRL-1658® der Firma American Type Culture Collection verwendet.

#### 3.1.3 Maschinen und Equipment

Artikel	Hersteller
Western-Blot Membranen	Bio-Rad, USA
Countess® Automatischer Zellzähler	Thermo Fisher Scientific, USA
Heraeus® Zentrifuge Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, USA
Heraeus® Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, USA
Hochgeschwindigkeitszentrifuge	Hitachi, Japan
ImageQuant® LAS 4000 Imager	GE health care, USA
Magnetrührer	VWR, USA
Mini spin Zentrifuge	Eppendorf, Deutschland
Mini spin Zentrifuge	VWR, USA
NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, USA
peqSTAR® Thermocycler	VWR, USA
Pipetten (automatisch): 10, 300 µl	Eppendorf, Deutschland

Pipetten (manuell): 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Gilson, Frankreich
Pipette (mehrfach): 300 µl	Eppendorf, Deutschland
Pipetboy®	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen: 10, 20, 100, 200, 300, 1000 µl	Sarstedt, Deutschland
PowerPac® Power Supply	Bio-Rad, USA
Precellys® 24 Homogenisierer	Bertin technologies, USA
QuantStudio® 3 Real time PCR System	Applied Biosystems, USA
StepOnePlus® Real time PCR System	Applied Biosystems, USA
SoftMax® Pro Software	Molecular Devices, USA
Thermo Shaker	Universal Labortechnik, Deutschland
TransBlot® Turbo Transfer System	Bio-Rad, USA
VersaMax® ELISA Microplate Reader	Molecular Devices, USA
Vortex Maschine	VWR, USA
Western Blot Kammern	Bio-Rad, USA

### 3.1.4 Reagenzien

#### 3.1.4.1 Chemikalien

Artikel	Hersteller
Acrylamide Lösung, Rotiphorese Gel 30	Roth, Deutschland
Accutase® Lösung	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ammonium Persulfat (APS)	Promega, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Thermo Fisher Scientific, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deutschland
Complete® Protease Inhibitor	Roche, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Roche, Deutschland
Dublecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)	Thermo Fisher Scientific, USA
Ethanol 70 %	Roth, Deutschland
Ethanol 100 %	Roth, Deutschland
Fetales Rinderserum (FBS)	PAA Laboratories, Österreich
Glycin	Roth, Deutschland
Chlorwasserstoff	Sigma-Aldrich, Deutschland

4x Laemmli Proben Puffer	Bio-Rad, USA
Lipofectamine® 2000	Thermo Fisher Scientific, USA
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide, Deutschland
Magnesiumchlorid (25 nM)	Applied Biosystems, USA
Magnesiumchlorid (50 nM)	Thermo Fisher Scientific, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Milchpulver	Roth, Deutschland
MuLV reverse Transkriptase	Applied Biosystems, USA
Nuklease freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, USA
Opti-MEM®	Thermo Fisher Scientific, USA
PCR-Puffer II 10x	Applied Biosystems, USA
PCR Nucleotide Mix (10 mM)	Promega, USA
Penicillin/Streptomycin Mischung (100x)	AppliChem, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 1x, 10x	Sigma-Aldrich, Deutschland
Precision Plus Protein® Dual color standard	Bio-Rad, USA
QiAzol® Lysereagenz	Qiagen, Deutschland
QuickStart® Bradford 1x Dye Reagenz	Bio-Rad, USA
RIPA® Puffer	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ribonuklease freies Wasser	Qiagen, Deutschland
Random Hexamers (50 µM)	Thermo Fisher Scientific, USA
Ribonuklease Inhibitor	Applied Biosystems, USA
RNaseZAP®	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumdodecylsulfat 10x Lösung	Promega, USA
SuperSignal® West femto maximum sensitivity Substrat	Thermo Fisher Scientific, USA
TE Puffer	Thermo Fisher Scientific, USA
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Bio-Rad, USA
Tris	Roth, Deutschland
Trypanblau Lösung 0,4 %	Thomas Scientific, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Deutschland

**3.1.4.2 Chemische Zusammensetzungen**Master Mix für cDNA Synthese aus mRNA:

Reagenz	Volumen (pro Reaktion)
10x PCR Puffer II	4 µl
Magnesiumchlorid Lösung (25 nM)	8 µl
PCR Nukleotid Mix (10 mM)	2 µl
Random hexamers (50 µM)	2 µl
Ribonuklease Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
MuLV reverse Transkriptase (50 U/µl)	2 µl
Ribonuklease freies Wasser	1 µl
Total	20 µl

Master Mix für cDNA Synthese aus microRNA:

Reagenz	Volumen (pro Reaktion)
5x miScript HiSpec Puffer	4 µl
10x miScript Nukleotid Mix	2 µl
Ribonuklease freies Wasser	5 µl
miScript reverse Transkriptase	2 µl
Total	13 µl

mRNA-qRT-PCR:

Reagenz	Volumen (pro Reaktion)
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	13 µl
Magnesiumchlorid Lösung (50 nM)	1 µl
Primer Mix	1 µl
Ribonuklease freies Wasser	8 µl
Total	23 µl

microRNA-qRT-PCR:

Reagenz	Volumen (pro Reaktion)
2x QuantiTect SYBR Green PCR	12,5 µl
Master mix	
10x miScript Universal Primer Mix	2,5 µl
10x miScript Specific Primer Assay	2,5 µl
Ribonuklease freies Wasser	5,0 µl
Total	22,5 µl

**3.1.4.3 Puffer**

Blockierlösung:

Reagenz	Menge/Konzentration
Milchpulver	5 %
PBS	1x

SDS Laufpuffer:

Reagenz	Menge/Konzentration
Glycin	192 mM
Tris (pH 7.5)	25 mM
SDS	0,1 %

Transfer Puffer:

Reagenz	Menge/Konzentration
Glycin	163 mM
Tris (pH 7.5)	20 mM
Methanol	20 %

Waschpuffer:

Reagenz	Menge/Konzentration
PBS	1x
Tween 20	0,1 %

**3.1.4.4 Gele**SDS-Sammelgel:

Reagenz	Menge/Konzentration
30 % Acrylamid	5 %
Tris (pH 6.8)	125 mM
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,1 %

SDS-Trenngel (10 %):

Reagenz	Menge/Konzentration
30 % Acrylamid	10 %
Tris (pH 8.8)	375 mM
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,065 %

SDS-Trenngel (7 %):

Reagenz	Menge/Konzentration
30 % Acrylamid	7 %
Tris (pH 8.8)	375 mM
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,065 %

### 3.1.5 Kits

Produkt	Hersteller	Katalognummer
miRNeasy® Mini Kit	Qiagen	217004
Precellys® Lyse Kit	Precellys	KT03961-1-003.2
miScript® II RT Kit	Qiagen	218161
miScript® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen	218073
mirVana miRNA Isolation Kit	Thermo Fisher	AM1560

### 3.1.6 Antikörper

Primärer Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
anti-Tropoelastin	Hase	1 : 200	abcam	ab21600
Anti-ADAMTS7	Hase	1 : 500	abcam	ab203027
anti-β-Actin	Hase	1 : 1000	Cell Signal	4967

Sekundärer Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
anti-rabbit IgG	Ziege	1 : 3000	Thermo Fisher	31460

### 3.1.7 Primer

Die Sequenzen der Primer stammten entweder aus anderen Publikationen, der PrimerBank Online Datenbank [99] oder wurden mittels der PrimerBLAST-Software [111] für das jeweilige Zielgen angepasst.

Alle Primer für die qRT-PCR Analyse der mRNA Transkription wurden speziell für ihre jeweiligen Zielgene hergestellt. Jeder Primer wurde vor der ersten Benutzung in einem Primer Verdünnungstest getestet. Die Primer hatten eine Ausgangskonzentration von 100 pmol/μl und wurden jeweils für die Versuche 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt.

Primer für die mRNA-Transkription:

Gen	Primer	Sequenz (5'– 3')
<i>Eln</i>	Forwärts	TGT CCC ACT GGG TTA TCC CAT
	Rückwärts	CAG CTA CTC CAT AGG GCA ATT TC
<i>Adamts7</i>	Forwärts	GCA GGC TTC GTC TGC TTT CTA
	Rückwärts	GCC ATC AGA TAA GGG TTG GTG G
<i>Polr2a</i>	Forwärts	CTA AGG GGC AGC CAA AGA AAC
	Rückwärts	CCA TTC AGC ATA CAA CTC TAG GC

Primer für die microRNA-Transkription:

Ziel	Hersteller	Katalognummer
Mm_miR-29a-3p	Qiagen	MS00001372
Mm_miR-29a-5p	Qiagen	MS00032641
Mm_miR-29b-3p	Qiagen	MS00005936
Mm_miR-29c-3p	Qiagen	MS00001379
Hs_RNU6-6p	Qiagen	MS00033740
miR-16 (Stem-Loop PCR)	Thermo Fisher	4427975

### 3.1.8 Synthetische microRNAs und antimicroRNAs

In vivo Versuche:

Name	Hersteller	Sequenz
antimiR-29a-3p	Exiqon	5'-GATTTTCAGATGGTGCT-3'
Kontrollsequenz	Exiqon	5'-ACGTCTATACGCCCA-3'

In vitro Versuche:

Name	Hersteller	Katalognummer
miR-29a-3p mimic	Qiagen	MSY0000535
miR-29a-3p Inhibitor	Qiagen	MIN0000535
Kontrollsequenz	Qiagen	1027280

### 3.1.9 *In-Situ* Hybridisierung

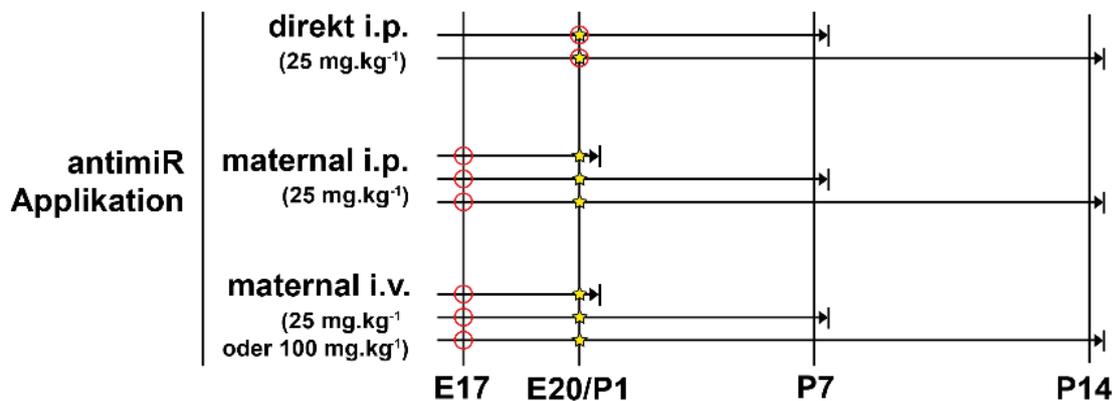
Sonde gerichtet gegen	Sequenz
antimiR-29a-3p	5'-AGCACCATCTGAAATC-3'
miR-122	5'-CAAACACCATTGTCACACTCCA-3'
Kontrollsequenz	5'-TCTAACACGTCTATACGCCCA-3'

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 *In vivo* Untersuchungen

#### 3.2.1.1 Inhibition von microRNA-29a-3p

Um die Expression der microRNA-29a-3p (miR-29a-3p) in Mäusen zu beeinflussen, wurde ein synthetischer microRNA Hemmstoff, eine antimiR, verwendet. Alternativ erhielten die Mäuse eine „scrambled“ Kontrollsequenz.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der zeitlichen Versuchsabläufe.** Die Injektionen (O; intravenös oder intraperitoneal) der antimiR-29a-3p oder einer scrambled antimiR erfolgten am 17. Schwangerschaftstag (E17) bei maternaler Verabreichung und am 1. postnatalen Tag (P1) bei direkter Administration. Die Injektionsdosen betragen 25 mg/kg KG bei direkter und 25 bzw. 100 mg/kg KG bei maternaler Applikation. Die Organentnahme (→) erfolgte am 1., 7. oder 14. postnatalen Tag (P1, P7, P14).

#### 3.2.1.1.1 Direkte Injektion der antimicroRNA

Um den Effekt einer direkten antimiR Injektion auf die Expression von miR-29a-3p in jungen Mäusen zu untersuchen, wurden jeweils 12 Mausjungtiere black six (C57BL/6J, von Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld) in zwei Gruppen unterteilt. Tiere aus der ersten Gruppe erhielten eine einzelne intraperitoneale Injektion einer Kontrollsequenz in einer Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht am 1. postnatalen Tag.

Die zweite Gruppe erhielt eine Injektion der miR-29a-3p spezifischen antimiR in derselben Dosis. Die Tiere wurden bei Raumtemperatur (22 °C) und einem 12 Stunden Tag/12 Stunden Nacht Zyklus gehalten, Wasser und Futter stand *ad libitum* zur Verfügung.

Die postnatalen Tage 1, 7 und 14 wurden als Analysezeitpunkte festgelegt, an jedem dieser Tag erfolgte die Organentnahme bei sechs Tieren aus jeder Gruppe.

#### 3.2.1.1.2 Maternale Verabreichung der antimicroRNA

Plug checked schwangere black six (C57BL/6J) Muttertiere erhielten eine Injektion entweder mit der Kontrollsequenz (scr.) oder der antimiR (ant.), dies geschah intravenös (IV) über die Schwanzvene oder intraperitoneal (IP) am 17. Schwangerschaftstag. Die Dosis lag jeweils bei 25 mg/kg Körpergewicht. Insgesamt wurden 16 Mütter injiziert, vier pro Kondition (IV scr., IV ant., IP scr., IP ant.)

Das Experiment wurde mit einer höheren Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht antimiR oder Kontrollsequenz via intravenöser Injektion wiederholt (IV scr., IV ant.).

Nach der Geburt wurden die Neugeborenen gleichmäßig auf die Käfige aufgeteilt, sodass sich in jedem Käfig mindestens sechs Jungtiere und eine Mutter befanden.

Die Jungtiere und die dazugehörigen Mütter wurden am 1., 7. oder 14. postnatalen (P) Tag getötet. Um genügend Gewebe für die Protein- und Genexpressionsanalyse zu erhalten, mussten für den Zeitpunkt P1 Tiere aus zwei Käfigen pro Kondition zusammen analysiert werden.

### 3.2.1.2 Organentnahme

Alle Tiere wurden zunächst mit Isofluran narkotisiert und danach durch eine Injektion von Pentobarbital (0,8 mg in 50 µl) getötet. Nach vorsichtiger Öffnung des Abdomens wurde zunächst das Zwerchfell durchstoßen, sodass die Lunge kollabierte.

Danach wurde der Thorax mittels Durchtrennung des Sternums eröffnet. Lunge und Herz wurden dann nach Punktion der Vena cava inferior mit 1x PBS gespült, um das Gewebe möglichst weitgehend von verbleibendem Blut zu reinigen. Gewebeproben aus Herz, Leber, Lunge und Niere wurden entnommen. Nach Öffnung des Schädels wurden auch Proben von Hirngewebe entnommen. Alle Gewebeproben wurden direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach für weitere Analysen bei -80 °C gelagert.

## 3.2.2 *In vitro* Untersuchungen

### 3.2.2.1 Kultivierung von NIH/3T3 Maus Fibroblasten ähnlichen Zellen

Die NIH/3T3 mouse fibroblast-like Zellen (CRL-1658, American Type Culture Collection) wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kultivierungsflaschen inkubiert. Als Medium wurden 10 ml Dublecco's modified eagle medium (D-MEM) mit 10 %-igem Zusatz von fetalem Rinderserum (FBS) und 1 %-igem Zusatz einer Penicillin/Streptomycin Mischung verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95-100 % Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Jeweils nach Erreichung einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen prozessiert. Hierzu wurden zunächst 5 ml Accutase® Lösung für 5 min in die Flaschen gegeben, um die Zellen vom Boden abzulösen. Dann wurden 5 ml der oben beschriebenen supplementierten D-MEM Mischung hinzugefügt, um die Accutase® zu neutralisieren. Nun wurden die Zellen 1:10 mit D-MEM verdünnt und in neue Kultivierungsflaschen überführt. Für die *in vitro* Untersuchungen wurden die Zellen dann in Titrierplatten überführt und dort ebenfalls mit der D-MEM Lösung inkubiert.

### 3.2.2.2 Zellzählung

Um vergleichbare Ergebnisse aus den *in vitro* Untersuchungen zu erhalten, mussten jeweils gleiche Anzahlen von Zellen in die Mikrotitrierplatten überführt werden. Für die Zellzählung wurde der Countess® Automated Cell Counter verwendet. Vor den Messungen wurden die Zellen zunächst mit 1x PBS und danach mit 5 ml Accutase®, wie bereits zuvor beschrieben (3.2.2.1), behandelt.

Nach der Verdünnung wurden jeweils 5 µl der Zelllösung 1:10 mit 45 µl Trypanblau verdünnt. 10 µl dieser Mischung wurden dann auf einen speziellen Zähl-Objekträger pipettiert und in der Zählmaschine platziert. Mit der aus der Zählung errechneten Zellzahl in den jeweiligen Proben konnten dann gleiche Zellmengen in Mikrotitrierplatten überführt werden.

### 3.2.2.3 Transfektion der Zellen mit synthetischer microRNA-29a-3p

Für die Transfektion wurden gleiche Anzahlen der Fibroblasten in 6-well Platten gesät. Als Medium für die Transfektion wurde Opti-MEM® verwendet, als Transfektionsreagenz Lipofectamine entsprechend den Herstellerangaben.

80 nM microRNA bzw. scrambled Kontrollsequenz wurden mit Ribonuklease freiem Wasser verdünnt und anschließend das Medium Opti-MEM® hinzugefügt. Für die mock Gruppe wurde nur Opti-MEM® verwendet. Nach 5-minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von Lipofectamine® und nach erneuter 20 minütiger Inkubation die vorsichtige Überführung der Lösungen in die 6-well plates. Die Zellen wurden mit 80 nM microRNA/scrambled Kontrollsequenz und 4 µl Lipofectamine® in 2 ml Opti-MEM® Medium pro Well transfiziert.

Nach 6 Stunden erfolgte das Waschen der Zellen und die Überführung in neue Kultivierungsflaschen.

### 3.2.3 Genexpressionsanalyse

#### 3.2.3.1 Isolation von Ribonukleinsäuren

Ribonukleinsäuren (RNA) wurden aus Homogenisaten ganzer Mausorgane und NIH/3T3 Mausfibroblasten isoliert. In beiden Fällen wurde ein miRNeasy® Mini-Kit (Qiagen®) und ein Precellys® Gewebe RNA-Kit nach den jeweiligen Herstellerprotokollen verwendet.

##### 3.2.3.1.1 Isolation aus Zellen

Die Zellen wurden in jeweils gleicher Anzahl wie zuvor beschrieben (3.2.2.1 und 3.2.2.2) aus den Kulturflaschen auf Mikrotitrierplatten überführt. Nach Inkubation und Erreichen einer Konfluenz von 40 % wurden jedem Well 300 µl QiAzol® Lysereagenz hinzugefügt und die Mischung danach in spezielle 2 ml Lyseröhrchen (Precellys® Kit) gefüllt. Die Röhrchen enthielten kleine Keramikugeln mit einem Durchmesser von 1,4 mm, die der Homogenisierung dienten. Die Homogenisierung wurde zwei Mal für jeweils 20 s bei 5000 Umdrehungen pro Minute im Precellys® 24 Homogenisierer durchgeführt. Nachfolgend wurden die Homogenisate für wenige Sekunden herunter zentrifugiert und in 1,5 ml Röhrchen überführt. 70 µl Chloroform wurden jeder Probe hinzugefügt, bevor diese für 15 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert wurden. Hiernach wurden 85 µl des Überstandes mit 263 µl reinem Ethanol gemischt und in mRNeasy® mini-spin Röhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation der Röhrchen für 15 s bei 10.000 Umdrehungen pro Minute wurde der flüssige Durchfluss im unteren Teil verworfen. Nach drei weiteren Waschvorgängen der Membran mit RWT und RPE RNA Waschpuffer aus dem mRNeasy®-Kit konnten 30 µl Ribonuklease freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert werden. Die RNA wurde dann in einem letzten Schritt durch eine erneute Zentrifugation für 1 Minute bei 10.000 Umdrehungen pro Minute aus der Membran gelöst und in das Ribonuklease freie Wasser überführt. Die RNA-Proben wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

### 3.2.3.1.2 Isolation aus Mausgewebe

Tiefgefrorene Proben der Mausorgane wurden in 2 ml Precellys® Lyseröhrchen gegeben. Nach Zugabe von 300 µl QiAzol® Lysereagenz wurden die Proben zwei Mal für je 20 s bei 5.000 Umdrehungen pro Minute im Precellys® 24 Homogenisierer prozessiert. Die folgenden Schritte bis zur RNA-Gewinnung waren dieselben wie für die RNA-Isolation aus Zellen (3.2.3.1.1).

### **3.2.3.2 Messung der Ribonukleinsäure (RNA) Konzentration**

Zur Messung der RNA-Konzentration wurde das NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Absorption und der Konzentration. Aufgrund dieser Gegebenheiten kann die Spektrophotometrie zur Konzentrationsmessung und darüber hinaus zur Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren eingesetzt werden. Für diese Messungen wird die optische Dichte von Ribonukleinsäuren in einer Konzentration von 40 µg/ml gleich dem Wert 1,0 gesetzt. Somit lassen sich anhand der gemessenen optischen Dichte einer RNA-Probe Berechnungen zu deren Konzentration anstellen. Zudem können mit dem Verhältnis der optischen Dichten (OD) bei 260 nm (RNA) und 280 nm (Proteine) Rückschlüsse auf die Reinheit der Probe gezogen werden. Reine RNA-Proben sollten ein OD<sub>260/280</sub> Verhältnis von ~2,0 haben, während ein Wert deutlich unter 2,0 für eine Kontamination der Probe mit Proteinen spricht.

### **3.2.3.3 Synthese komplementärer Desoxyribonukleinsäuren (cDNA)**

#### 3.2.3.3.1 Synthese komplementärer Desoxyribonukleinsäuren aus mRNA

Die Herstellung von cDNA aus messenger-Ribonukleinsäuren (mRNA) ist eine reverse Transkription, für die eine RNA-abhängige DNA-Polymerase namens reverse Transkriptase (RT) verwendet wird. Dieser Prozess wurde gleichermaßen für RNA aus

NIH/3T3 Fibroblasten und aus Organhomogenisaten durchgeführt. Für jede Reaktion wurde 1 µg RNA mit 19 µl Ribonuklease freiem Wasser gemischt. Die Proben wurden dann in einem Thermo Cycler für 10 min bei 70 °C erhitzt, um die RNA zu denaturieren. Danach wurden jeweils 20 µl Master Mix hinzugefügt:

Reagenz	Volume (pro Reaktion)
10x PCR Puffer II	4 µl
Magnesiumchlorid Lösung (25 mM)	8 µl
PCR Nukleotid Mix (10 mM)	2 µl
Random hexamers (50 µM)	2 µl
Ribonuklease Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
MuLV reverse Transkriptase (50 U/µl)	2 µl
Ribonuklease freies Wasser	1 µl
Total	20 µl

Die cDNA-Synthese wurde im peqSTAR® Thermocycler mithilfe des folgenden Protokolls durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Effekt
1.	21 °C	10 min	Anlagerung der random hexamers
2.	43 °C	75 min	Reverse Transkription
3.	99 °C	5 min	Inaktivierung der Transkriptase
4.	4 °C	-	Abkühlen und Lagern der Proben

Die hergestellte cDNA wurde mit 60 µl Ribonuklease freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C für weitere Analysen gelagert.

#### 3.2.3.3.2 Synthese komplementärer Desoxyribonukleinsäuren aus microRNA

Das Prinzip der cDNA-Herstellung aus microRNA ist das Gleiche wie bei der Gewinnung aus mRNA und auch hier wurde die gleiche Vorgehensweise für RNA aus NIH/3T3 Fibroblasten und aus Organhomogenisaten verwendet. Für jede Reaktion wurden 0,5 µl der isolierten RNA mit 6,5 µl Ribonuklease freiem Wasser gemischt. Danach wurden 13 µl des folgenden Master Mixes hinzugegeben:

Reagenz	Volume (pro Reaktion)
5x miScript HiSpec Puffer	4 µl
10x miScript nucleics mix	2 µl
Ribonuklease freies Wasser	5 µl
miScript reverse Transkriptase	2 µl
Total	13 µl

Die Reaktion wurde im peqSTAR® Thermocycler nach folgendem Protokoll ausgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Effekt
1.	37 °C	60 min	Anlagerung der random hexamers
2.	95 °C	5 min	Reverse Transkription
3.	4 °C	-	Abkühlen und Lagern der Proben

Die amplifizierte cDNA wurde dann mit 200 µl Ribonuklease freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.3.4 Quantitative real-time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Um die Expression eines bestimmten Gens in der zuvor synthetisierten cDNA quantifizieren zu können, wurde die quantitative real-time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) verwendet. Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase wurde zusammen mit Primern für das spezifische Zielgen verwendet, um so eine exponentielle Amplifikation zu erreichen.

##### 3.2.3.4.1 mRNA-qRT-PCR

Zur Quantifizierung der cDNA-Menge wurde die Cyanin Farbe SYBR® Green in dieser Reaktion verwendet. Die Fluoreszenz dieses Färbemittels wird verstärkt, wenn es an kleine Gruben doppelsträngiger DNA bindet und korreliert dann mit der Gesamtmenge der cDNA. Die PCR-Maschine detektiert diese Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 520 nm und berechnet somit die cDNA-Konzentration in dieser spezifischen Probe.

Verwendet man nun Primer, die spezifisch nur an das gewünschte Zielgen binden, kann so die Stärke der Genexpression dieses Gens über die Fluoreszenz der Probe bestimmt werden.

Für die qRT-PCR Analyse wurde Platinum® SYBR® Green qPCR-Mix UDG von Invitrogen® zusammen mit spezifisch synthetisierten Primern verwendet.

Reagenz	Volumen (pro Reaktion)
Platinum® SYBR® Green qPCR	13 µl
SuperMix-UDG	
Magnesiumchlorid Lösung (50 nM)	1 µl
Primer Mix	1 µl
Ribonuklease freies Wasser	8 µl
<b>Total</b>	<b>23 µl</b>

Zu diesen 23 µl Master Mix wurden 2 µl zuvor hergestellte Proben-cDNA pipettiert. Die Proben wurden in Duplikaten getestet, 2 µl Ribonuklease freies Wasser gemischt mit ebenfalls 23 µl Master Mix wurden als Negativkontrollen verwendet, um mögliche Kontaminationen zu detektieren. Für die Reaktion selbst wurde das StepOnePlus® oder das QuantStudio® 3 Real Time PCR System nach folgendem Protokoll verwendet.

Schritt	Effekt	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
1.	Polymerase Aktivierung	50 °C	2 min	
2.	Polymerase Aktivierung	95 °C	5 min	
3.	Denaturierung	95 °C	5 s	40x
4.	Primeranlagerung	59 °C	5 s	
5.	Elongation	72 °C	30 s	
6.		95 °C	15 s	
7.	Schmelzkurve	60-95 °C	variabel	
8.	Abkühlen	25 °C	variabel	

Die Schmelzkurven-Analyse wird durchgeführt, um unspezifische Primer Dimere von den eigentlichen PCR Produkten unterscheiden zu können. In diesem Schritt wird dazu die Temperatur langsam kontinuierlich von 60 °C auf 95 °C erhöht.

Die Bindungskraft der gewünschten Reaktionsprodukte (doppelsträngige DNA) ist stärker als die der Primer Dimere, infolgedessen wird auch eine höhere Temperatur zur Denaturierung der DNA benötigt. Die Fluoreszenz der SYBR® Green Farbe sollte in

diesem Schritt also erst bei hohen Temperaturen stark zunehmen, da sie sich erst bei diesen Temperaturen von denaturierender DNA lösen kann und entsprechend detektiert wird. Für kleine Primer Dimere würde man einen Anstieg der Fluoreszenz schon bei deutlich niedrigeren Temperaturen erwarten.

Für jede Probe berechnet die PCR-Maschine einen Ct-Wert (Cycle threshold). Dieser Wert repräsentiert den Zyklus in dem die Fluoreszenz der SYBR® Green Farbe einen bestimmten Grenzwert überschritten hat. Um diesen Ct-Wert interpretieren zu können, wurden die Ct-Werte zu den Ct-Werten eines Referenzgens normalisiert ( $\Delta Ct = Ct_{\text{Ref}} - Ct_{\text{Probe}}$ ). Die Polymerase *Pol2ra* wurde für die mRNA-qRT-PCR als Referenzgen verwendet. Die Ct-Werte des Zielgens wurden von den Ct-Werten des Referenzgens subtrahiert und der errechnete  $\Delta Ct$ -Wert der ersten Gruppe wurde mit dem der Kontrollgruppe verglichen ( $\Delta\Delta Ct$ -Wert).

#### 3.2.3.4.2 microRNA-qRT-PCR

Das Prinzip der qRT-PCR ist für micro- und messenger-RNA gleich. Es wurde lediglich ein anderer Master Mix verwendet:

Reagenz	Volumen (pro Reaktion)
2x QuantiTect SYBR Green PCR	12,5 $\mu$ l
Master Mix	
10x miScript Universal Primer Mix	2,5 $\mu$ l
10x miScript Specific Primer Assay	2,5 $\mu$ l
Ribonuklease freies Wasser	5,0 $\mu$ l
Total	22,5 $\mu$ l

Auch das Reaktionsprotokoll der PCR-Maschine unterscheidet sich:

Schritt	Effekt	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
1.	Denaturierung	95 °C	15 min	40x
2.	Primeranlagerung	94 °C	15 s	
3.	Elongation	55 °C	30 s	
4.		70 °C	30 s	
5.	Schmelzkurve	95 °C	15 s	
6.	Abkühlen	60-95 °C	variabel	
7.	Denaturierung	25 °C	variabel	

Als Referenzgen für die microRNA-qRT-PCR wurde das hoch konservierte Gen *U6* verwendet [23].

### 3.2.4 Analyse der Proteinexpression

#### 3.2.4.1 Proteinisolation

##### 3.2.4.1.1 Proteinisolation aus Fibroblasten

Für die Lyse der Zellen wurde eine spezielle Lösung hergestellt. Diese bestand aus RIPA® Puffer, dem 40 µl Complete® Proteaseinhibitor und 10 µl Vanadate pro 1 ml Puffer hinzugefügt wurden. 150 µl dieser Mischung wurden dann in jedes Well der Mikrotitrationsplatten überführt. Mithilfe eines Zellkratzers wurden die Zellen dann vom Boden der Wells gelöst und das Lysat in 1,5 ml Röhren pipettiert. Nachfolgend wurden die Proben 45 min auf Eis inkubiert und alle 5 min mittels Vortex Maschine durchmischt. Es erfolgte die Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min bei 4 °C. In einem letzten Schritt wurde der Überstand, der die aufgereinigten Proteine enthielt, in neue 1,5 ml Röhren gefüllt und bei -20 °C für weitere Analysen gelagert.

#### 3.2.4.1.2 Proteinisolation aus Organgewebe

Die tiefgefrorenen Proben des Organgewebes wurden in die 2 ml Homogenisierungsröhrchen gegeben, die auch schon für die RNA-Isolation verwendet wurden. 300 µl des zuvor beschriebenen Lysepuffers aus RIPA® Puffer, Vanadate und Complete® Puffer wurden hinzugefügt und die Proben dann im Precellys® Homogenisierer für zwei Mal 20 s bei 5.000 rpm verarbeitet. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Röhrchen überführt und die letzten Schritte der Isolation entsprechend dem Protokoll, das schon bei der Isolation aus Zellen angewandt wurde, durchgeführt.

#### **3.2.4.2 Messung der Proteinkonzentration**

Zur Messung der Proteinkonzentration in Proben aus Fibroblasten und Organgewebe wurde der Bradford-Test durchgeführt. Dieser Test basiert auf einer photometrischen Messung mit einer Absorptionsänderung des Färbemittels Coomassie Brilliant-Blau G250. In seiner reinen Form ist der Farbstoff rot, in saurem Milieu oder nach Komplexierung mit Proteinen ändert sich die Farbe zu blau. Die Farbänderung ist dabei abhängig von der Menge der in der Probe enthaltenen Proteine und führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 zu 595 nm. Diese Wellenlängenänderung kann in einem speziellen Gerät gemessen und so die Proteinkonzentration errechnet werden.

Die Proben und der Lysepuffer wurden 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt und dann als Triplikate in eine 96-well Platte pipettiert. Eine Standardkurve wurde unter Zuhilfenahme verschiedener prädefinierter Konzentrationen (0,05 bis 0,5 µg/µl) von bovinem Serumalbumin und destilliertem Wasser als Nullwert erstellt. Der verdünnte Lysepuffer ohne zugesetzte Proteine diente als Referenzwert. 200 µl des Bradford Farbstoffs wurde jedem Well hinzugefügt, nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte dann im VersaMax® ELISA Microplate Reader gemessen. Zur Auswertung wurde das Programm SoftMax® Pro verwendet.

### 3.2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur weiteren Analyse der Proteinexpression in den zuvor gemessenen Proben, wurden diese in einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierzu wurden 7 oder 10 % Sammelgele und ein 5 % Trenngel verwendet. Mithilfe der zuvor berechneten Proteinkonzentrationen wurde ein Volumen, das 40 µg Proteine enthält, mit einer Mischung aus einem Teil 4x Laemmli Probenpuffer und neun Teilen Dithiothreitol (DTT) vermischt. In der folgenden Gelelektrophorese hat das Natriumdodecylsulfat (SDS) die Funktion sekundäre und tertiäre Proteinstrukturen aufzubrechen, das DTT reduziert Disulfidbrücken innerhalb der Proteine. Die Proben wurden 10 min bei 95 °C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Danach wurden sie in die Wells des Sammelgels pipettiert. Ein Proteinmarker, der aus Proteinen definierter Größe besteht, wurde zum späteren Vergleich in das erste Well pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt und die Elektrophorese mit dem Anlegen einer Spannung von 100 V für 70 bis 90 min gestartet.

### 3.2.4.4 Western Blot

Die spezifischen Proteine konnten nach Auftrennung in der Elektrophorese mittels Western Blotting detektiert werden. Die Proteine wurden von dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine 0,2 µm Nitrozellulose-Membran übertragen, hierzu wurde entweder das TransBlot® Turbo System (bei einer vermuteten Proteingröße < 100 kDa) oder eine Elektrophoresekammer (vermutete Proteingröße > 100 kDa) mit dem oben beschriebenen Transfer-Puffer bei 90 V für 90 min verwendet. Der Transfer im TransBlot® System wurde entsprechend den Herstellerangaben mit 25 V und 1,3 A für 10 min durchgeführt. Danach wurden jeweils unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation in 5 % Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur belegt. Die Membranen wurden danach mit 1x PBS gewaschen und über Nacht mit dem primären spezifischen Antikörper in 5 % Blockierlösung bei 4 °C inkubiert. Die Antikörper wurden in der oben angegebenen Verdünnung entsprechend den Herstellerangaben angewandt. Am nächsten Tag erfolgte das 6-malige Waschen der Membranen für jeweils 5 min in 1x PBS und die Inkubation mit anti-Hase IgG Sekundärantikörper ebenfalls in 5 % Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur. Um die gesuchten Proteine sichtbar zu machen, wurde das chemilumineszente SuperSignal® West femto maximum sensitivity Substrat nach kurzem Waschen mit 1x PBS auf die Membranen pipettiert.

Die Membranen wurden zur Auslesung im ImageQuant® LAS 4000 System platziert und mehrere Bilder bei verschiedenen Belichtungszeiten angefertigt. Als Referenz wurde danach das Protein beta-Aktin verwendet. Nach dem bereits beschriebenen Protokoll wurde die Membran erneut für einige Stunden mit beta-Aktin Primärantikörper und nachfolgend mit anti-Hase Sekundärantikörper inkubiert. Auch hier folgte die Auslesung im ImageQuant® System. Die angefertigten Aufnahmen konnten nachfolgend auf unterschiedliche Expressionen des gesuchten Proteins verglichen mit dem Kontrollprotein beta-Aktin untersucht werden.

### 3.2.5 Stem-Loop real-time RT-PCR

Zur Detektion von antimiR-29a-3p in Probengewebe wurde unter anderem das Verfahren der stem-loop real-time RT-PCR nach etablierten Protokollen verwendet [13].

Hierzu wurde Leber-, Nieren- und Lungengewebe von Mausjungern am 7. postnatalen Tag (*P7*) entnommen, deren Mütter zuvor am 17. Schwangerschaftstag eine intravenöse Injektion mit antimiR-29a-3p oder einer Kontrollsequenz (jeweils 100 mg/kg KG) erhalten hatten.

Zur weiteren Prozessierung wurden kleine RNAs inklusive der microRNAs mithilfe eines mirVana® miRNA Isolations Kit nach Herstellerangaben aus den Proben gewonnen.

Die nachfolgende Taqman Analyse wurde als kommerzielle Dienstleistung von der Axolabs GmbH durchgeführt. Es wurden für antimiR-29a-3p spezifisch hergestellte Primer (Thermo Fisher, Assay CTXGPY7) und Primer für miR-16 verwendet. Das Signal von miR-16 fungierte bei der Analyse als Positivkontrolle, das antimiR-29a-3p Signal aus Gewebe, welches nur mit einer Kontrollsequenz behandelt wurde, als Negativkontrolle.

Nachfolgend wurde das antimiR-29a-3p Signal aus dem mit antimiR-29a-3p behandelten Gewebe zunächst gegen das miR-16 Signal normalisiert. Anschließend erfolgte die Normalisierung gegen das antimiR-29a-3p Signal aus den mit Kontrollsequenz behandelten Proben, sodass Einflüsse möglicher Vorläufer microRNAs ausgeschlossen werden konnten.

### 3.2.6 *In-Situ* Hybridisierung

Als weiteres Verfahren zur anti-miR-29a-3p Detektion wurde das Verfahren der *In-Situ* Hybridisierung (beschrieben in Nielsen et. al [74] und Gallo Cantafio et. al [30]) angewandt.

Es wurde Lebergewebe von Mausjungern am 7. postnatalen Tag verwendet, deren Mütter zuvor eine intravenöse Injektion mit anti-miR-29a-3p oder einer scrambled Kontrollsequenz erhalten hatten (jeweils 100 mg/kg KG). Außerdem wurde auch Lebergewebe eines Muttertieres am 7. postpartalen Tag analysiert.

Die Lebern der Tiere wurden über die Leberarterie mit PBS gespült und anschließend für 48 Stunden in 10 % Formalin fixiert. Nachfolgend wurden die Organe in Paraffin eingebettet und in 5 µm dünne Schichten geschnitten.

Die eigentliche *In-Situ* Hybridisierung wurde von Bioneer A/S als kommerzielle Dienstleistung durchgeführt. Hierbei wurden doppelt Digoxigenin markierte Sonden gegen anti-miR-29a-3p (5 nM, Hybridisierung bei 56 °C), eine als Positivkontrolle fungierende Sonde gegen miR-122 (10 nM, Hybridisierung bei 58 °C) und eine Kontroll-Sonde als Negativkontrolle (10 nM, Hybridisierung bei 58 °C) eingesetzt.

Zur Detektion wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter anti-Digoxigenin Antikörper verwendet. Die gezeigten Bilder wurden in einem Zeiss Axioscan® angefertigt.

### 3.2.7 RNA-Sequenzierung

Zunächst wurden die RNA Proben auf einem BioAnalyzer® 2100 (Agilent) untersucht und dann jeweils 300 ng der kleinen RNA Fraktion (< 200 nt) mittels TruSeq® Small RNA Library Kit (Illumina) analysiert. Vor der PCR Reaktion wurde eine Größenselektion mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese durchgeführt. Die restliche Präparation der Bibliotheken erfolgte gemäß etablierter Protokolle. Dabei wurde der komplette cDNA Pool amplifiziert und die Bibliotheken nach Anzahl der Fragmente in einer Spanne von 145-160 Basenpaaren zusammengefasst. Diese Größenselektion wurde in einem PippinHT® System (Sage Science) auf 3 % Agarose Kassetten durchgeführt. Die Zielgröße wurde dabei auf 154 Basenpaare angesetzt.

Die eigentliche Sequenzierung wurde auf einem NextSeq500® Sequenzierer (Illumina) mit v2 Reagenzien durchgeführt mit durchschnittlich 9 Millionen Zählungen pro Probe. Die Rohdaten wurden nach Qualität und Duplikationsraten mittels FastQC® Software aufgenommen. Die Sequenzierungsdaten wurden mithilfe der MIRPIPE® Anwendung analysiert [52], welche kostenlos und frei zugänglich durch das Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim entwickelt und bereitgestellt wird (<https://bioinformatics.mpi-bn.mpg.de/>). Die Rohdaten wurden anhand eines Qualitätsschwellenwertes von  $Q \geq 20$  mittels cutadapt verarbeitet. Nur Werte innerhalb der Zielgröße zwischen 18 und 28 Nukleotiden wurden ausgewählt, um möglichst nur reife microRNAs zu zählen. Duplikate wurden herausgerechnet. Nur Sequenzen, die in geringer Anzahl (Standardwert = 5) vorkamen, wurden für weitere Analysen berücksichtigt. Werte von isomiRs wurden mit den jeweiligen miRNAs kombiniert.

Die resultierenden Sequenzen wurden mit Sequenzen aus der murinen mirBase® Datenbank verglichen. Abweichend exprimierte miRNAs wurden mittels DESeq2 Version 1.62 identifiziert [63]. Nur Gene mit einem Benjamini-Hochberg  $P$ -Wert  $< 0,1$  und einem Minimum von fünf kombinierten counts wurden als signifikant abweichend exprimiert gewertet. Korrigierte  $P$ -Werte wurden mit der Methode von Benjamini und Hochberg berechnet [8]. Die RNA-Sequenzierungsdaten wurden in die NCBI Gene Expression Omnibus Datenbank aufgenommen und können über die GEO Series Nummer GSE110888 aufgerufen werden. Die RNA Sequenzierung wurde von Dr. Stefan Günther (ECCPS Bioinformatics and Deep Sequencing Platform, Max-Planck-Institut für Herz und Lungenforschung Bad Nauheim) durchgeführt.

### **3.2.8 *In silico* Analyse**

Die Online-Datenbank TargetScan Version 7.1 ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org); [1]), Diana microT Version 5.4 (<https://mrmicrot.imsi.athenarc.gr/?r=mrmicrot/index>; [65]) und miRBase version 21 (<http://www.mirbase.org/search.shtml>; [34]) wurden zur Identifizierung möglicher Zielgene der microRNA-29a-3p verwendet.

### 3.2.9 Statistische Analyse

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism® 6.0 durchgeführt. Alle Ergebnisse werden  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Der ungepaarte Student's *t*-Test wurde zum Vergleich von zwei Gruppen verwendet, eine Analyse der Varianz (ANOVA) mit einem Tukey's *post-hoc* Test wurde zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen genutzt. Vor diesen Analysen wurden Ausreißer mittels Grubbs Test identifiziert. *P* Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

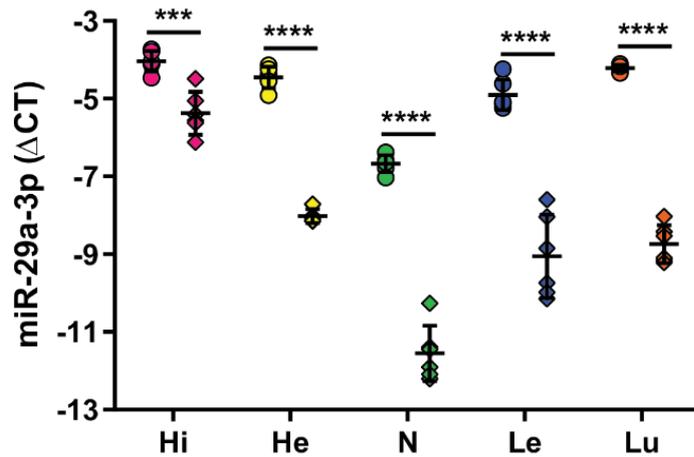
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 *In vivo* Applikation von antimiR-29a-3p führt zu verminderter miR-29a-3p Expression in allen untersuchten Organen

Hauptziel dieser Studie war es, den Effekt einer maternalen antimiR-29a-3p Applikation auf die miR-29a-3p Expression der Folgegeneration zu untersuchen. Zuvor sollte aber die Wirkung der antimiR auf die miR-29a-3p Expression bei direkter Injektion in Mausjungtiere untersucht werden.

Hierzu erhielten neugeborene Mäuse eine intraperitoneale Injektion mit antimiR-29a-3p oder einer scrambled Kontrollsequenz am Tag der Geburt jeweils in einer Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht (Abbildung 3). Am 7. postnatalen Tag (P7) wurden die Jungtiere und die dazugehörigen Mütter getötet und Gewebe von Hirn, Herz, Niere, Leber und Lunge für weitere Analysen entnommen. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde eine real-time RT-PCR zur Detektion der miR-29a-3p Expression in den jeweiligen Organgeweben durchgeführt.

Die Expression stabiler miR-29a-3p war dabei in allen untersuchten Organen im Vergleich zu den Werten aus der scrambled Kontrollgruppe vermindert (Abbildung 4). Der stärkste Effekt zeigte sich in der Niere und der Lunge ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 5$ ), gefolgt von Leber ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 4$ ) und Herz ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 3,5$ ). In Hirngewebe war der Effekt am schwächsten ausgeprägt ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 1,5$ ).



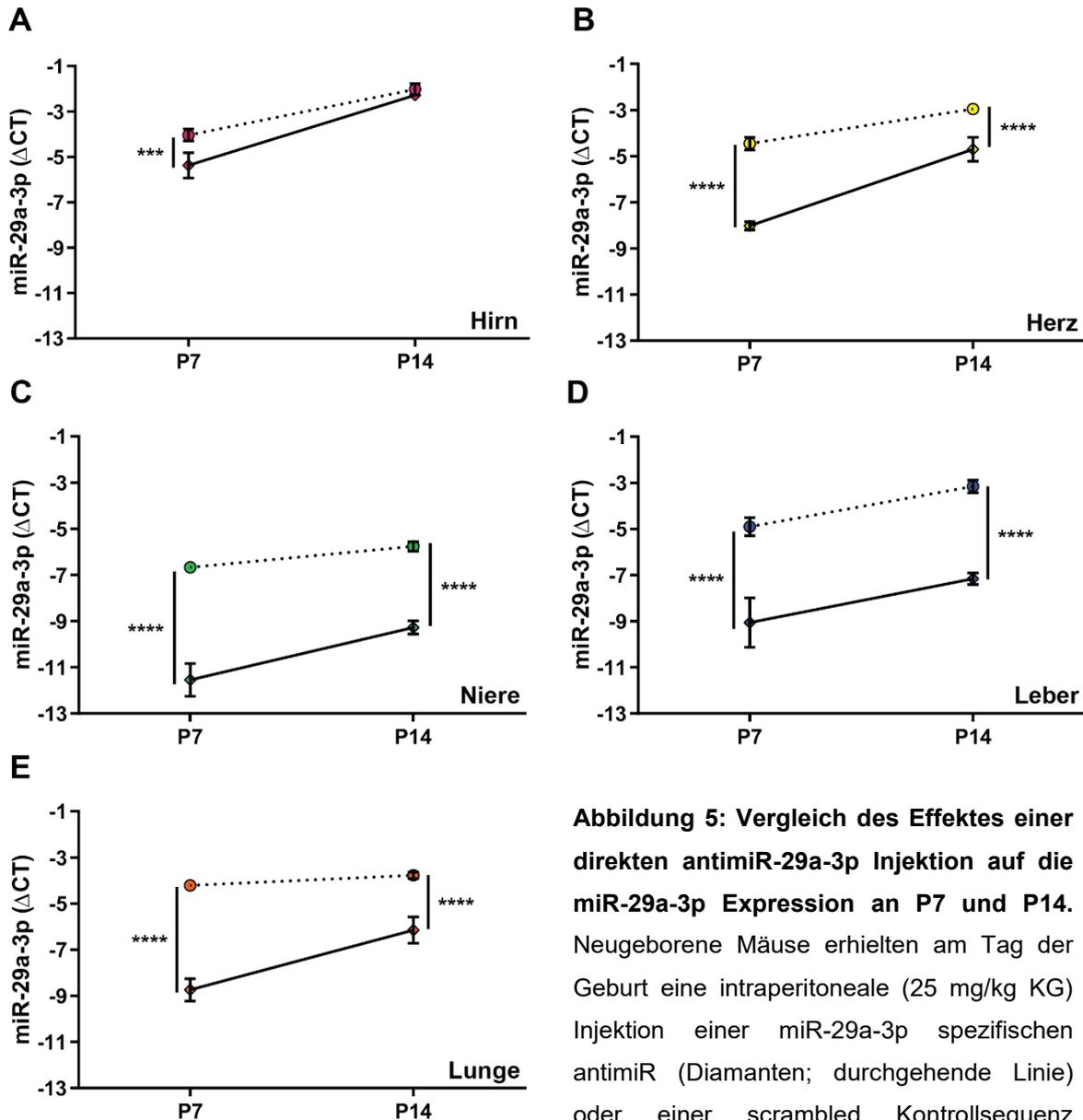
**Abbildung 4: Effekt einer direkten anti-miR-29a-3p Injektion auf die miR-29a-3p Expression in verschiedenen Organen.** Neugeborene Mäuse erhielten am Tag der Geburt eine intraperitoneale Injektion (25 mg/kg KG) einer für miR-29a-3p spezifischen anti-miR (Diamanten) oder eine Kontrollsequenz (Kreise; scrambled). Hirn (Hi) Herz (He), Niere (N), Leber (Le) und Lunge (Lu) wurden am 7. postnatalen Tag entnommen. Mittels qRT-PCR wurden die RNA Pools auf miR-29a-3p untersucht. Die Expression ist als mittlerer  $\Delta Ct$ -Wert  $\pm$  SD dargestellt.  $\Delta Ct = Ct(Rnu6) - Ct(miR-29a-3p)$ ,  $n = 5-6$  Tiere pro Gruppe; jedes Symbol repräsentiert ein Tier. Es wurden die Mittelwerte zwischen der scrambled und der anti-miR-29a-3p Gruppe mit Student's ungepaartem  $t$ -Test verglichen. (\*\*\*)  $P < 0,001$ ; (\*\*\*\*)  $P < 0,0001$ .

## **4.2 Der Effekt von antimiR-29a-3p auf die miR-29a-3p Expression bleibt auch zwei Wochen nach Applikation erhalten**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine direkte antimiR-29a-3p Applikation am Tag der Geburt einen messbaren Effekt auf die miR-29a-3p Expression am 7. postnatalen Tag hat, sollte weiterführend untersucht werden, wie sich die microRNA Expression im weiteren Verlauf verhält. Als weiterer Untersuchungszeitpunkt wurde der 14. postnatale Tag (P14) ausgewählt.

Wie oben beschrieben erhielten Mausjungtiere am Tag der Geburt (P1) eine intraperitoneale Injektion (25 mg/kg KG) mit antimiR-29a-3p oder einer scrambled Kontrollsequenz (Abbildung 3). Untersucht wurde Hirn-, Herz-, Nieren-, Leber- und Lungengewebe an den postnatalen Tagen P7 und P14. Die Expressionslevel von miR-29a-3p an diesen beiden Zeitpunkten wurden dann miteinander verglichen.

Die signifikant geringere Expression von miR-29a-3p in der antimiR, verglichen mit der scrambled Gruppe, zeigte sich im Hirngewebe an P14 nicht mehr (Abbildung 5A). Der Effekt in den anderen Organen blieb verglichen mit P7 zwar bestehen, fiel aber mit einer Reduktion der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte um  $\sim 2$  im Herz,  $\sim 1,5$  in der Lunge und  $\sim 1$  in der Niere deutlich schwächer aus. Lediglich in der Leber war eine etwa gleich starke Reduktion der Expressionen an P7 und P14 zu beobachten (siehe Abbildung 5B-E).



**Abbildung 5: Vergleich des Effektes einer direkten anti-miR-29a-3p Injektion auf die miR-29a-3p Expression an P7 und P14.** Neugeborene Mäuse erhielten am Tag der Geburt eine intraperitoneale (25 mg/kg KG) Injektion einer miR-29a-3p spezifischen anti-miR (Diamanten; durchgehende Linie) oder einer scrambled Kontrollsequenz (Kreise, gepunktete Linie). Die Organentnahme fand am 7. (P7) und 14. (P14) postnatalen Tag statt. Analysiert wurde der Einfluss der an P1 injizierten anti-miR auf die Expression von miR-29a-3p an P7 und P14 mittels qRT-PCR in Hirn-, Herz-, Nieren-, Leber- und Lungengewebe. Die miR-29a-3p Expression ist als mittlerer  $\Delta Ct$ -Wert  $\pm$  SD dargestellt.  $\Delta Ct = Ct(Rnu6) - Ct(miR-29a-3p)$ ,  $n = 5-6$  Tiere pro Gruppe; zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wird auf die Darstellung einzelner Datenpunkte für jedes Tier verzichtet. Es wurden die Mittelwerte zwischen der scrambled und der anti-miR-29a-3p Gruppe mit Student's ungepaartem  $t$ -Test verglichen. (\*\*\*)  $P < 0,001$ ; (\*\*\*\*)  $P < 0,0001$ .

(Kreise, gepunktete Linie). Die Organentnahme fand am 7. (P7) und 14. (P14) postnatalen Tag statt. Analysiert wurde der Einfluss der an P1 injizierten anti-miR auf die Expression von miR-29a-3p an P7 und P14 mittels qRT-PCR in Hirn-, Herz-, Nieren-, Leber- und Lungengewebe. Die miR-29a-3p Expression ist als mittlerer  $\Delta Ct$ -Wert  $\pm$  SD dargestellt.  $\Delta Ct = Ct(Rnu6) - Ct(miR-29a-3p)$ ,  $n = 5-6$  Tiere pro Gruppe; zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wird auf die Darstellung einzelner Datenpunkte für jedes Tier verzichtet. Es wurden die Mittelwerte zwischen der scrambled und der anti-miR-29a-3p Gruppe mit Student's ungepaartem  $t$ -Test verglichen. (\*\*\*)  $P < 0,001$ ; (\*\*\*\*)  $P < 0,0001$ .

### 4.3 Effekt von antimiR-29a-3p auf die Expression von miR-29a-5p, miR-29b-3p und miR-29c-3p

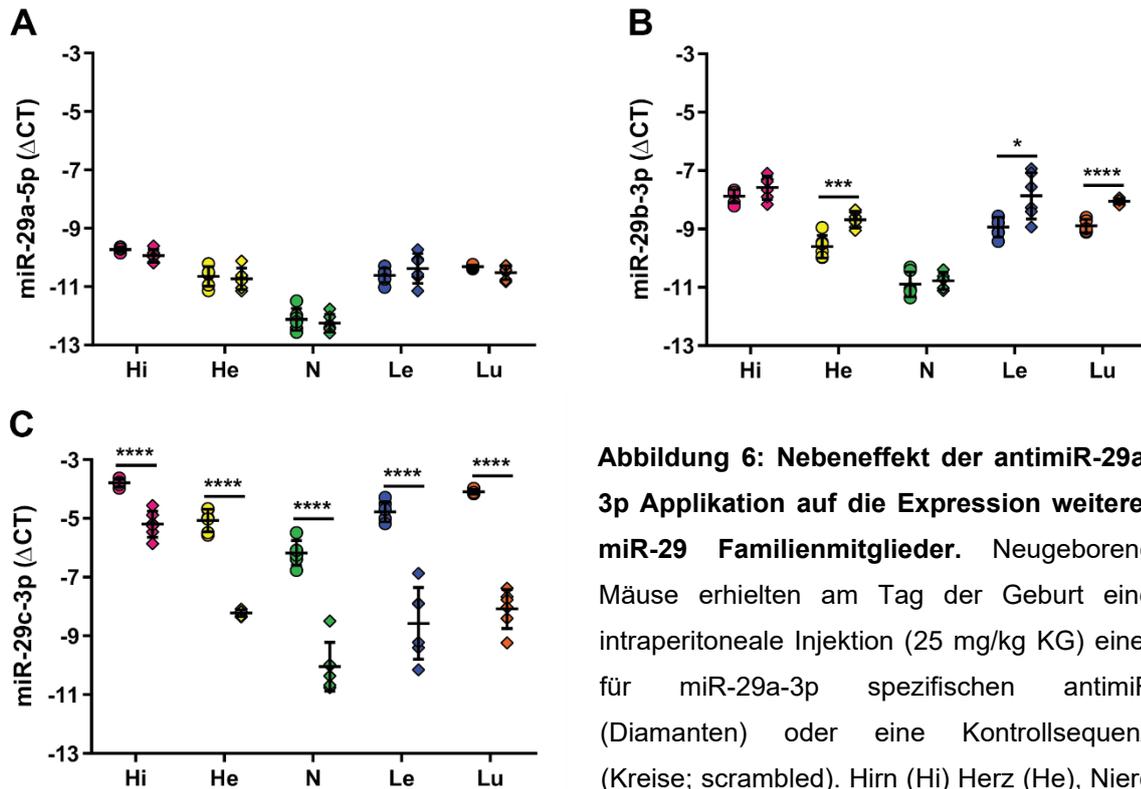
Neben dem gewünschten Effekt der antimiR Applikation auf die miR-29a-3p Expression sollten auch mögliche Nebeneffekte auf die Expression der anderen miR-29 untersucht werden. Hierzu wurden der zur Ziel-microRNA komplementäre Strang miR-29a-5p und die 3p-Stränge der miR-29b und miR-29c untersucht.

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde Hirn-, Herz-, Nieren-, Leber- und Lungengewebe von sieben Tage alten Mäusen untersucht, die am Tag ihrer Geburt eine intraperitoneale Injektion mit antimiR-29a-3p oder einer scrambled Kontrollsequenz erhalten hatten (jeweils 25 mg/kg KG). Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

Wie erwartet zeigte sich keine Veränderung der miR-29a-5p Expression, da es sich um den zur Ziel-microRNA komplementären Strang handelt.

MiR-29b-3p und miR-29c-3p haben die gleiche Seed Sequenz wie miR-29a-3p (Abbildung 2), sodass vermutlich aus diesem Grund auch durch antimiR-29a-3p Behandlung ein Effekt auf die Expression von miR-29b-3p und miR-29c-3p beobachtet werden konnte. So war für miR-29b-3p in Herz, Leber und Lunge eine signifikant vermehrte Expression jeweils mit einem  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert von circa 1 zu beobachten (Abbildung 6B).

Der Effekt von antimiR-29a-3p auf die Expression von miR-29c-3p fiel ähnlich stark wie auf miR-29a-3p aus, ebenso die Richtung im Sinne einer Reduktion der Expression. Wie bei miR-29a-3p war die Differenz in Niere, Lunge und Leber am größten ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 4$ ), gefolgt von Herz ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 3,5$ ) und Hirn ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 1,5$ ) (Abbildung 6C).



**Abbildung 6: Nebeneffekt der anti-miR-29a-3p Applikation auf die Expression weiterer miR-29 Familienmitglieder.** Neugeborene Mäuse erhielten am Tag der Geburt eine intraperitoneale Injektion (25 mg/kg KG) einer für miR-29a-3p spezifischen anti-miR (Diamanten) oder eine Kontrollsequenz (Kreise; scrambled). Hirn (Hi) Herz (He), Niere (N), Leber (Le) und Lunge (Lu) wurden am 7. postnatalen Tag entnommen. Mittels qRT-PCR wurden die RNA Pools auf miR-29a-5p (A), miR-29b-3p (B) und miR-29c-3p (C) untersucht. Die Expression der jeweiligen microRNAs ist als mittlerer  $\Delta Ct$ -Wert  $\pm$  SD dargestellt.  $\Delta Ct = Ct(Rnu6) - Ct(\text{jeweilige miR})$ ,  $n = 5-6$  Tiere pro Gruppe; jedes Symbol repräsentiert ein Tier. Es wurden die Mittelwerte zwischen der scrambled und der anti-miR-29a-3p Gruppe mit Student's ungepaartem  $t$ -Test verglichen. (\*)  $P < 0,05$ ; (\*\*\*)  $P < 0,001$ ; (\*\*\*\*)  $P < 0,0001$ .

#### 4.4 Maternale Applikation von anti-miR-29a-3p verringert die Expression von miR-29a-3p auch bei den neugeborenen Jungtieren

Nachdem in den Vorversuchen ein starker und zeitlich persistierender Effekt der direkten anti-miR-Gabe auf die miR-29a-3p Expression nachgewiesen werden konnte, sollte nun die maternale Verabreichung analysiert werden. Hierbei sollte auch untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen intravenöser und intraperitonealer Applikation der anti-miR gibt.

Es wurden Versuchsgruppen aus Jungtieren gebildet, deren Mütter jeweils am 17. Schwangerschaftstag (E17) eine Injektion mit anti-miR-29a-3p oder einer scrambled

Kontrollsequenz erhielten (Abbildung 3). Zunächst wurde analog zu den Vorversuchen eine Injektionsdosis von 25 mg/kg Körpergewicht bei intraperitonealer bzw. intravenöser (via Schwanzvene) Injektion gewählt und die miR-29a-3p Expression in den jeweiligen Organen der Mausjungen und Muttertiere mittels real-time RT-PCR gemessen.

#### 4.4.1 Jungtiere

Am ersten postnatalen Tag (P1) zeigte sich eine signifikante Reduktion der miR-29a-3p Expression in Herz und Niere für beide Injektionswege, zusätzlich in der Lunge bei der intraperitonealen, und in der Leber bei der intravenösen Verabreichung (Abbildung 7A).

Am 7. postnatalen Tag (P7) war ein signifikanter Unterschied nur noch in der Niere bei intraperitonealer und in Leber und Lunge bei intravenöser Injektion messbar (Abbildung 7B).

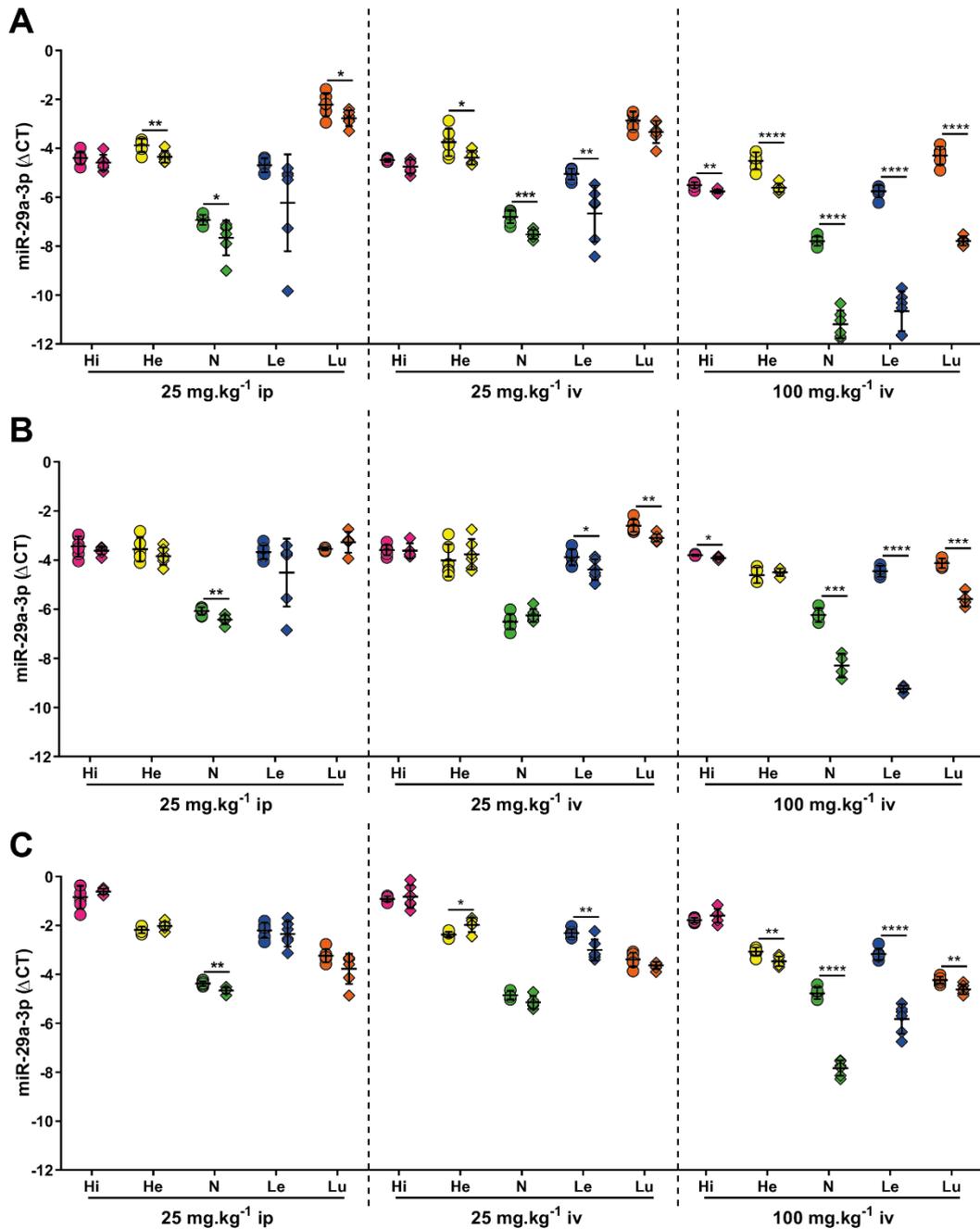
Der Effekt in der Niere bei intraperitonealer und in der Leber bei intravenöser Verabreichung blieb auch an Tag 14 (P14) erhalten, während der Effekt auf die Lunge in der intravenösen Gruppe verloren ging (Abbildung 7C).

Insgesamt war der Einfluss der maternalen antimiR Applikation auf die miR-29a-3p Expression in diesem Versuch inkonsistent und in seiner Stärke keinesfalls vergleichbar mit einer direkten Darreichung der antimiR. Möglicherweise war die aus den direkten Injektionen übernommene Dosierung für eine effektive maternale Transmission auf die Jungtiere nun zu gering, weshalb der Versuch im nächsten Schritt mit einer höheren Dosierung von 100 mg/kg KG wiederholt werden sollte. Aufgrund etwas vielversprechenderer Ergebnisse aus dem Vorversuch wurde die intravenöse Applikation weiterverfolgt.

Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der direkten antimiR Applikation sind nachfolgend vermehrt  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte angegeben.

Bei höherer Dosierung der antimiR zeigte sich an P1 (Abbildung 7A) eine deutlich stärkere und in allen Geweben signifikante Herabsetzung der miR-29a-3p Expression verglichen mit der niedrigeren Dosierung im Vorversuch. Am stärksten war der Effekt in Leber ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 5$ ), Lunge ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 3,5$ ) und Niere ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 3$ ) ausgeprägt. An P7 (Abbildung 7B) war der Effekt weiterhin in allen Organen außer dem Herz signifikant. Erneut fiel die Reduktion der Expression in der Leber am stärksten aus ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 4,5$ ) und war

vergleichbar mit der Reduktion an P1. In Niere ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 2$ ) und Lunge ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 1,5$ ) war der Effekt schwächer als am ersten Untersuchungszeitpunkt und auch schwächer als bei direkter Verabreichung der antimiR ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 5$  für Niere und Lunge und  $\sim 4$  in Lebergewebe bei direkter Injektion; siehe Abbildung 4). Weitere 7 Tage später (P14; Abbildung 7C) war ein signifikanter Unterschied in Herz ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 0,5$ ), Niere ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 3$ ), Leber ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 3,5$ ) und Lunge ( $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 0,5$ ) zu beobachten. Verglichen mit den direkt injizierten Mäusen war der Effekt in Niere und Leber ähnlich stark ausgeprägt (Niere  $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 3,5$ , Leber  $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 4$  bei direkter Injektion, siehe Abbildung 5), in Herz und Lunge fand sich eine schwächere Reduktion als bei direkter Injektion (Lunge  $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 2$ , Herz  $\Delta\Delta\text{Ct} \sim 1,5$  bei direkter Injektion, siehe Abbildung 5).



**Abbildung 7: Effekt einer maternalen anti-miR-29a-3p Applikation auf die miR-29a-3p Expression der Mausjungten in verschiedenen Organen.** Am 17. Schwangerschaftstag erhielten schwangere Mäuse eine intravenöse (25 mg/kg KG oder 100 mg/kg KG) oder intraperitoneale (25 mg/kg KG) Injektion mit einer Kontrollsequenz (Kreise) oder mit anti-miR-29a-3p (Diamanten). Die Organentnahme bei den Jungtieren fand am 1. (P1; A), 7. (P7; B) oder 14. (P14; C) postnatalen Tag statt. Es wurden jeweils Hirn- (Hi), Herz- (He), Nieren- (N), Leber- (Le) und Lungengewebe (Lu) entnommen und mittels qRT-PCR die miR-29a-3p Expression in den jeweiligen Geweben untersucht. Die Expression ist jeweils als  $\Delta Ct$ -Wert  $\pm$  SD angegeben.  $\Delta Ct = Ct(Rnu6) - Ct(miR-29a-3p)$ ,  $n = 4-6$  Tiere pro Gruppe; jedes Symbol repräsentiert ein Tier. Es wurden die Mittelwerte zwischen der scrambled und der anti-miR-29a-3p Gruppe mit Student's ungepaartem  $t$ -Test verglichen. (\*)  $P < 0,05$ ; (\*\*)  $P < 0,01$ ; (\*\*\*)  $P < 0,001$ ; (\*\*\*\*)  $P < 0,0001$ .

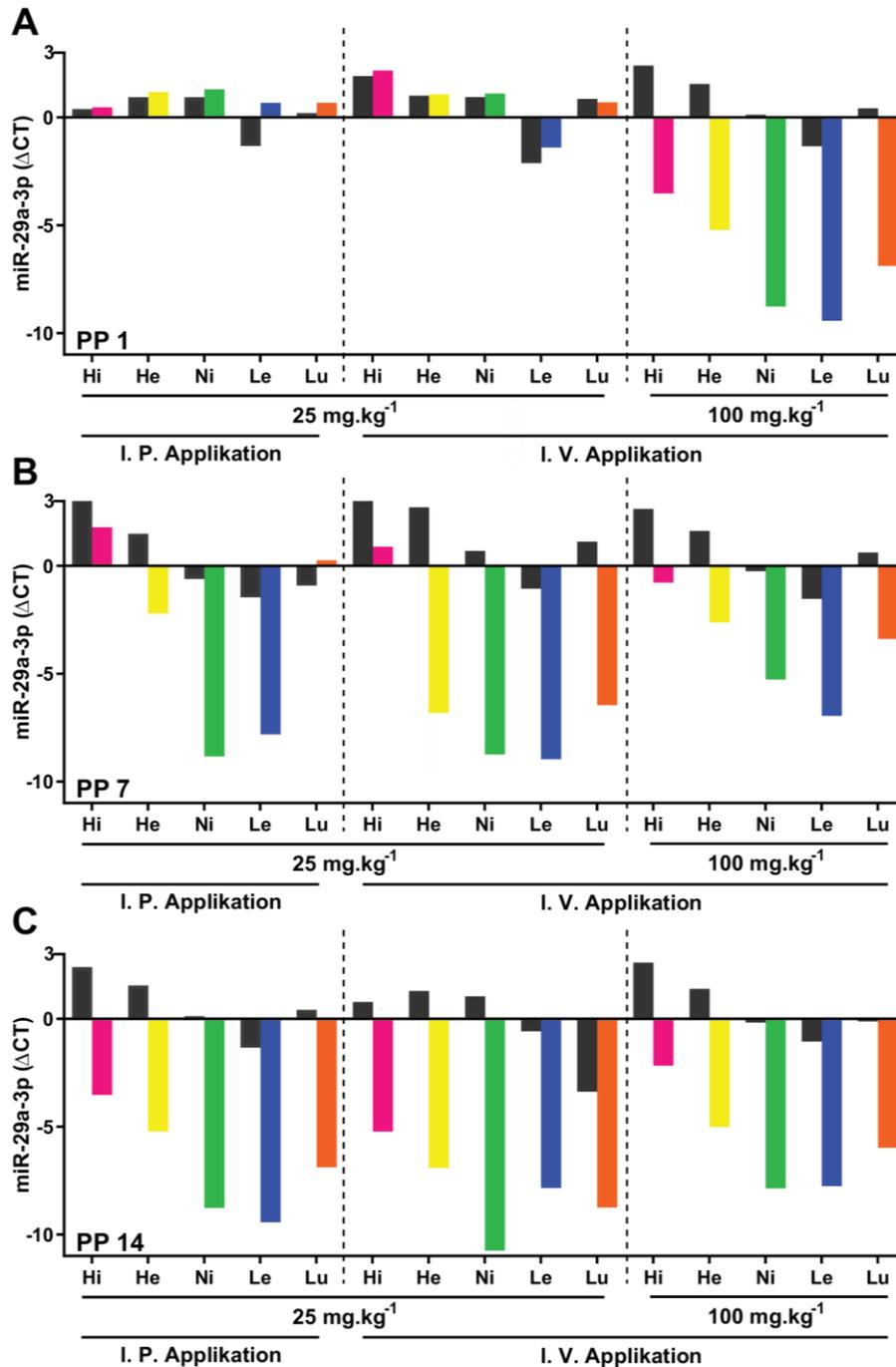
#### 4.4.2 Muttertiere

Auch bei den jeweiligen Muttertieren wurde die miR-29a-3p Expression in den verschiedenen Organen untersucht und soll nachfolgend dargestellt werden. Aufgrund der kleinen Gruppengrößen bei den Muttertieren (je nach Versuch und Gruppe teilweise nur ein Muttertier pro Versuchskondition) sind keine statistischen Tests angewendet worden. Abbildung 8 enthält daher keine statistischen Werte und diese Umstände sollten bei der Aussagekraft der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Bei den Muttertieren, die eine antimiR-29a-3p Dosis von 25 mg/kg KG erhalten hatten, zeigte sich am Tag der Geburt der Jungtiere (1. postpartaler Tag; PP1) keine Reduktion der miR-29a-3p Expression in keinem der untersuchten Organe, weder bei intravenöser noch bei intraperitonealer Injektion. Bei der Wiederholung des Versuches mit Erhöhung der Injektionsdosis auf 100 mg/kg KG und intravenöser Verabreichung hingegen, war bereits an PP1 eine deutlich verminderte miR-29a-3p Expression in allen untersuchten Organen messbar, am stärksten in Niere, Leber und Lunge (Abbildung 8A).

Am 7. postpartalen Tag zeigte sich in der ersten Gruppe (25 mg/kg KG Injektionsdosis intraperitoneal) eine starke Reduktion der Expression in Leber und Niere, weniger stark in Herzgewebe. In Hirn- und Lungengewebe war kaum ein Effekt erkennbar. Bei intravenöser Injektion und ebenfalls 25 mg/kg KG war der Effekt in Leber und Niere etwa gleich stark, hier konnte aber zusätzlich eine Reduktion der miR-29a-3p Expression in Lunge, Hirn und Herz nachgewiesen werden. Bei erhöhter Injektionsdosis von 100 mg/kg KG und intravenöser Applikation war ein Effekt in allen Organen erkennbar, tendenziell war dieser bis auf das Hirngewebe jedoch schwächer ausgeprägt als nach intravenöser Injektion der niedrigeren Dosis (Abbildung 8B).

Am 14. postpartalen Tag konnte in allen Organen bei allen Versuchskonditionen eine deutliche Reduktion der miR-29a-3p Expression nachgewiesen werden, auch hier war der Effekt im Hirngewebe allgemein am schwächsten ausgeprägt (Abbildung 8C).



**Abbildung 8: Expression von miR-29a-3p in verschiedenen Organen von mit anti-miR-29a-3p behandelten Muttertieren.** Mittels qRT-PCR wurde die Expression von miR-29a-3p in Hirn- (Hi), Herz- (He), Nieren- (N), Leber- (Le) und Lungengewebe (Lu) zuvor schwangerer Mäuse an den postpartalen Tagen 1 (PP 1; A), 7 (PP 7; B) und 14 (PP 14; C) untersucht. Die Mäuse hatten am 17. Schwangerschaftstag (embryonischer Tag; E17) eine intraperitoneale oder intravenöse Injektion mit entweder anti-miR-29a-3p (25 oder 100 mg/kg KG intravenös; 25 mg/kg KG intraperitoneal; farbige Balken) oder einer Kontrollsequenz (scrambled, 25 oder 100 mg/kg KG intravenös; 25 mg/kg KG intraperitoneal; graue Balken) erhalten. Die Expression ist jeweils als  $\Delta Ct$ -Wert angegeben.  $\Delta Ct = Ct(RnU6) - Ct(miR-29a-3p)$ . Aufgrund der kleinen Gruppengrößen sind keine statistischen Werte angegeben.

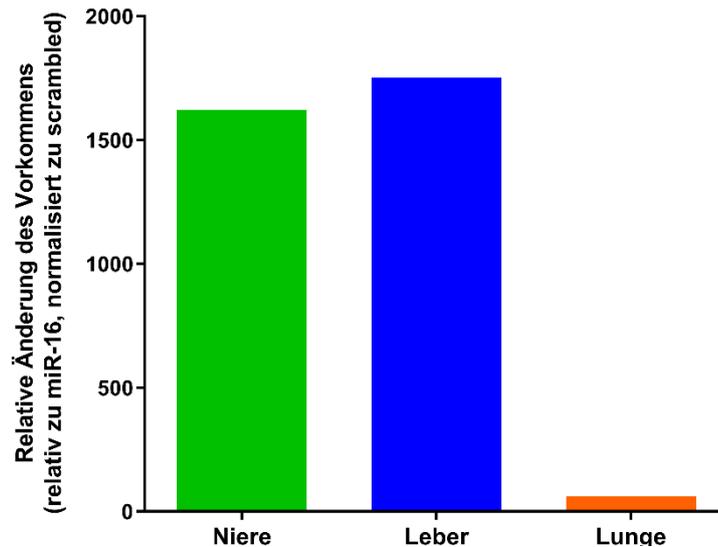
## 4.5 AntimiR-Nachweis in Gewebe mittels stem-loop RT-PCR und *In-Situ* Hybridisierung

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die antimiR Applikation sowohl auf direktem als auch maternalem Applikationsweg zu einer Verminderung der microRNA Expression führt. Des Weiteren sollte gezeigt werden, dass die erzielten Effekte tatsächlich auf die Applikation der antimiR zurückzuführen sind, die antimiR also die plazentare Barriere überschreiten und auf den microRNA-Pool der Nachkommen wirken kann.

Hierzu wurde Nieren-, Leber- und Lungengewebe von Mäusen, deren Mütter am 17. Schwangerschaftstag eine 100 mg/kg KG Dosis antimiR-29a-3p intravenös erhalten hatten, mit einer stem-loop real-time RT-PCR untersucht. Dargestellt sind die Ergebnisse als relative Häufigkeit des Vorkommens verglichen mit der Kontroll-microRNA miR-16 und normalisiert zur Gruppe, die mit der scrambled Kontrollsequenz injiziert wurden.

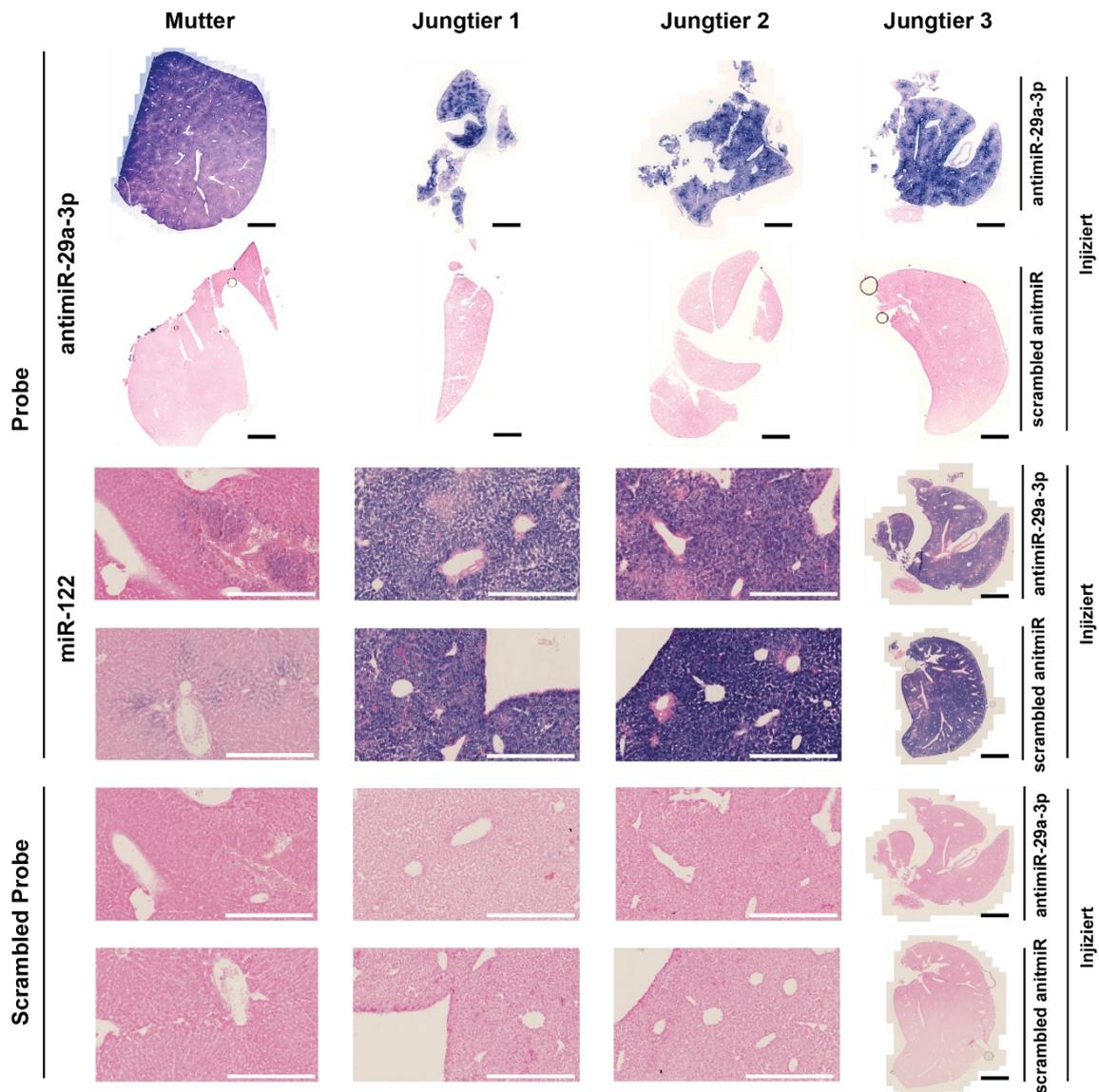
Der stärkste Effekt zeigte sich in der Leber mit einer relativen Häufigkeit von 1.750x, gefolgt von der Niere mit 1.600x und der Lunge mit noch 75x (Abbildung 9).

AntimiR-29a-3p konnte also in allen drei Geweben deutlich häufiger nachgewiesen werden als die Kontrollsequenz miR-16.



**Abbildung 9: AntimiR-29a-3p Detektion mittels stem-loop qRT-PCR in ausgewählten Organen von mit antimiR-29a-3p behandelten Mausjungen.** Die intravenöse Injektion von antimiR-29a-3p oder einer scrambled Kontrollsequenz in schwangere Mäuse erfolgte am 17. Schwangerschaftstag mit einer Dosis von jeweils 100 mg/kg. Mittels stem-loop PCR wurde antimiR-29a-3p dann in Nieren-, Leber- und Lungengewebe der Mausjungen am 7. postnatalen Tag nachgewiesen. Die Werte repräsentieren jeweils das Vielfache des Vorkommens des PCR-Produktes. Die Ergebnisse sind als relative Werte verglichen mit dem Vorkommen von miR-16 und normalisiert zur scrambled Kontrollgruppe dargestellt.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, sollte das Vorliegen von antimiR-29a-3p auch mittels *In-Situ* Hybridisierung nachgewiesen werden. Hierzu wurde Lebergewebe von Mausjungen am 7. postnatalen Tag (P7) untersucht, deren Mütter zuvor eine intravenöse Injektion mit 100 mg/kg KG antimiR-29a-3p oder einer scrambled Kontrollsequenz erhalten hatten. Des Weiteren wurde auch die Leber einer Mutter am 7. postpartalen Tag (PP7) untersucht. Als Positivkontrolle fungierte das Signal von miR-122, als Negativkontrolle eine scrambled Kontrollsequenz. Es sei erwähnt, dass miR-122 vor allem in der Leber vorkommt, dort vor allem in der zweiten postnatalen Woche exprimiert wird und die Expression sich dann mit fortschreitendem Alter vermindert [39, 103]. So ist zu erklären, dass sich ein starkes Signal für miR-122 bei den Mausjungen, nicht jedoch beim Muttertier zeigte. Das Signal für antimiR-29a-3p hingegen war sowohl bei den Mausjungen als auch bei der Mutter, die eine antimiR-29a-3p Injektion erhalten hatte, deutlich stärker ausgeprägt als in der scrambled Kontrollgruppe (Abbildung 10). Somit konnte mittels dieser beiden Verfahren das Vorliegen der antimiR im Gewebe der Mausjungtiere bestätigt werden.



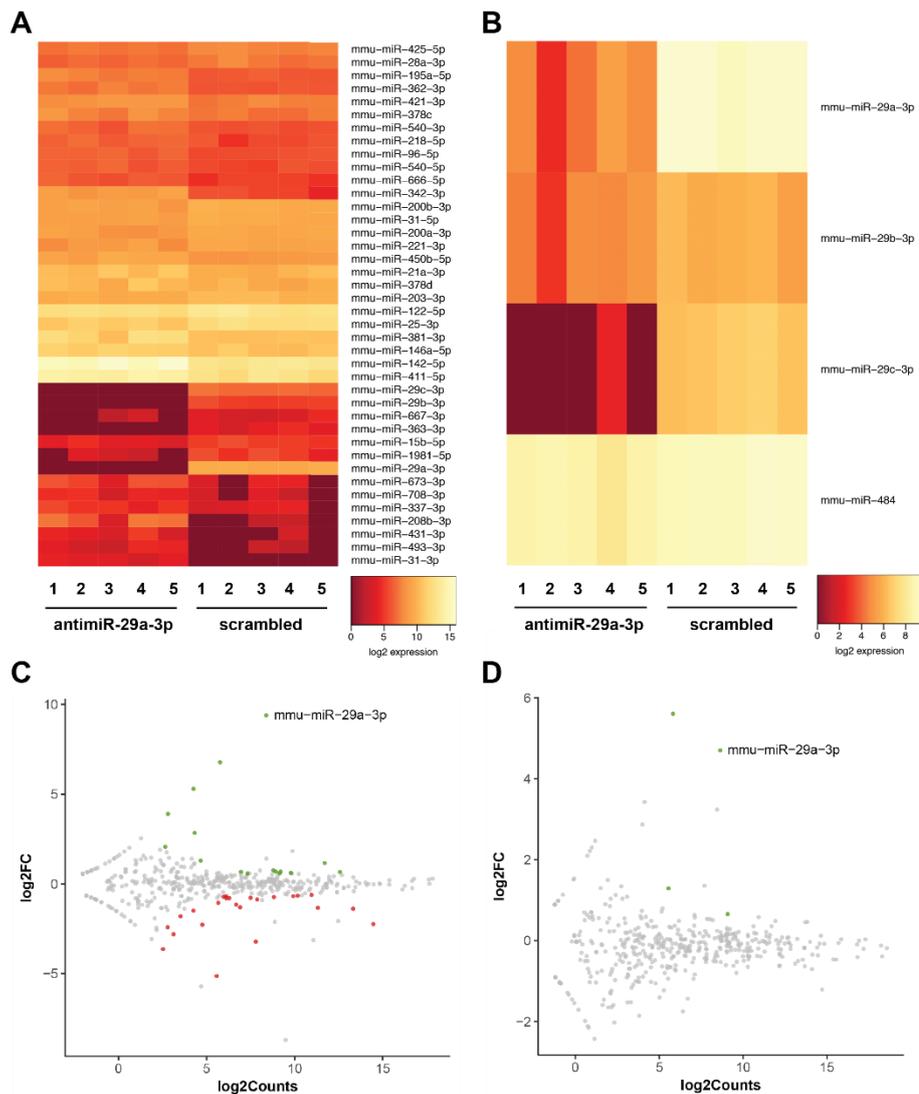
**Abbildung 10: Detektion von antimiR-29a-3p in ausgewählten Organen mittels *In-Situ* Hybridisierung.** Schwangere Mäuse erhielten am 17. Schwangerschaftstag (E17) eine intravenöse Injektion mit antimiR-29a-3p oder einer scrambled antimiR in einer Dosis von 100 mg/kg KG. Mittels *In-Situ* Hybridisierung wurde dann antimiR-29a-3p in den Lebern der Mutter und der Jungtiere am 7. postnatalen Tag (P7) detektiert. Dargestellt sind Schnittbilder aus Lebern eines Muttertieres und von drei Jungtieren. Mithilfe einer gegen antimiR-29a-3p gerichteten Sonde wurde dann antimiR-29a-3p in der *In-Situ* Hybridisierung nachgewiesen. Eine gegen miR-122 gerichtete Probe fungierte als Positivkontrolle, als Negativkontrolle wurde eine scrambled Sequenz verwendet. Für die Bilder von Jungtier 3 wurde eine geringere Vergrößerung gewählt, eine höhere Vergrößerung für die Bilder vom Muttertier und den Jungtieren 1 und 2. Der schwarze Maßstabsbalken entspricht 2 mm, der weiße 400 µm.

## 4.6 Effekte auf weitere microRNAs und Vergleich der Geburtsgewichte

Neben der erwarteten Verringerung der miR-29a-3p Expression durch Verabreichung von antimiR-29a-3p, sollte untersucht werden, ob auch Effekte auf weitere microRNAs zu beobachten sind. Eine RNA-Sequenzierung des microRNA-Pools aus Lebergewebe von direkt am Tag der Geburt injizierten Mausjungen (antimiR-29a-3p oder scrambled Sequenz; Dosis 25 mg/kg KG intraperitoneal) und Mausjungen von Müttern, die zuvor eine Injektion in einer Dosis von 100 mg/kg KG (antimiR-29a-3p oder scrambled Sequenz; intravenös) erhalten hatten, wurde hierzu durchgeführt.

Bei den direkt injizierten Mausjungen wurden signifikante Veränderungen der Expression von 40 microRNAs festgestellt, wobei 24 davon eine erhöhte Expression aufwiesen (Abbildung 11C). Der stärkste Effekt zeigte sich aber auf die Expression von miR-29a-3p in Form einer deutlichen Verringerung des Vorkommens. Auch die anderen beiden Familienmitglieder miR-29b und miR-29c wiesen veränderte Expressionen auf, hier war der Effekt allerdings schwächer ausgeprägt als bei miR-29a-3p.

Auch in Lebern von Mausjungen, deren Mütter zuvor mit 100 mg/kg KG antimiR-29a-3p injiziert wurden, war die stärkste Veränderung die Expressionsverringerng von miR-29a-3p. Hier zeigten sich allerdings bei insgesamt nur vier microRNAs Veränderungen der Expression. Neben miR-29a-3p, miR-29b und miR-29c traf dies für miR-484 zu. Alle vier microRNAs wiesen eine verminderte Expression auf (Abbildung 11D). Die kompletten Daten der RNA-Sequenzierung sind in der NCBI Gene Expression Datenbank unter der GEO series Zugangsnummer GSE110888 einsehbar.

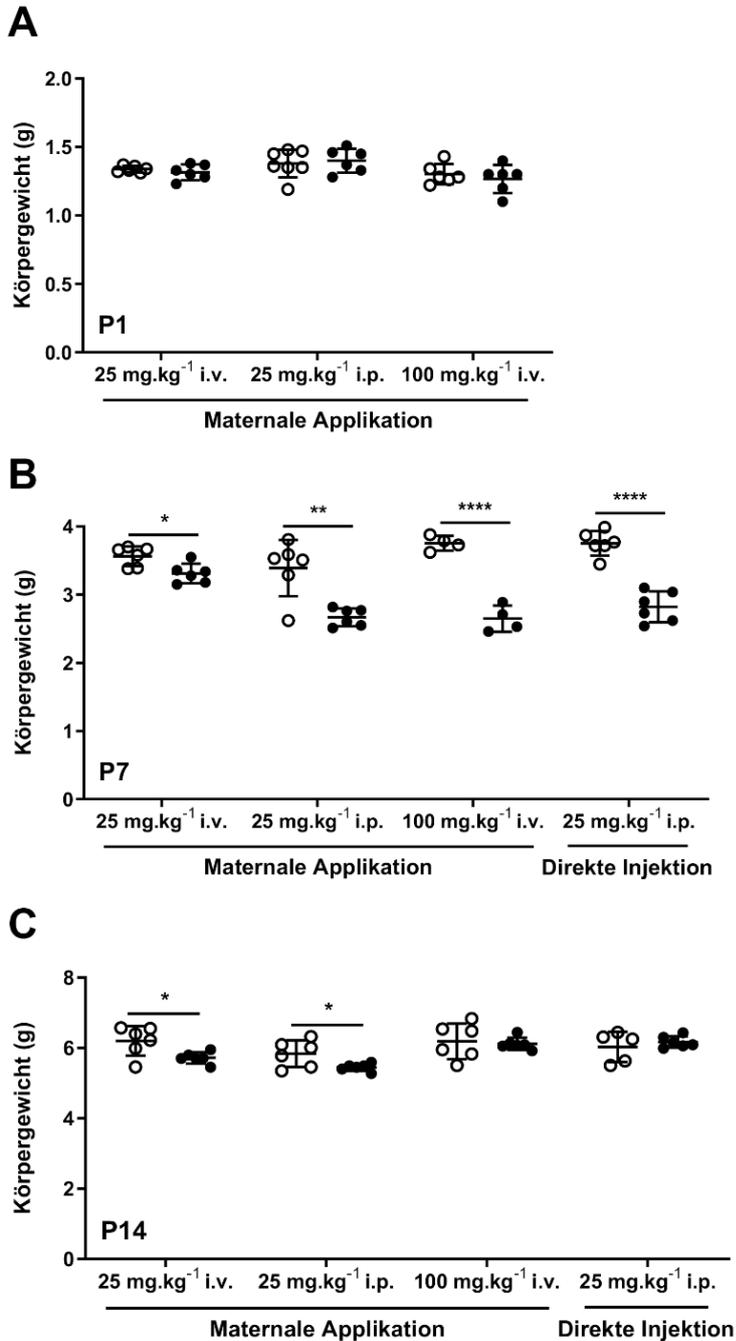


**Abbildung 11: Nebeneffekte auf andere microRNAs durch anti-miR-29a-3p Applikation.** Anti-miR-29a-3p oder eine scrambled Kontrollsequenz wurde schwangeren Mäusen am 17. Schwangerschaftstag (intravenös; 100 mg/kg KG) oder neugeborenen Mäusen am Tag der Geburt (postnataler Tag 1 (P1); intraperitoneal; 25 mg/kg KG) appliziert. Am 7. postnatalen Tag (P7) wurde Lebergewebe der direkt injizierten Mausjungen und der Jungen von zuvor behandelten Muttertieren entnommen. Nachfolgend wurde eine RNA-Sequenzierung des microRNA Pools des Lebergewebes durchgeführt. Heatmaps repräsentieren die RNA-seq Daten für Lebern von direkt injizierten Mausjungen (A) und von Jungtieren, deren Müttern zuvor anti-miR-29a-3p appliziert wurde (B). Dargestellt sind alle microRNA Spezies, die eine False Discovery Rate (FDR) < 0,1, mindestens 5 Reads und einen mindestens 1,5 fachen fold-change aufwiesen. Zusätzlich sind M/A Diagramme dargestellt, die das Verhältnis von  $\log_2(\text{fold-change})$  zu  $\log_2(\text{RNA-seq counts})$  zeigen. Grüne Punkte repräsentieren hierbei eine signifikant verminderte Expression, graue Punkte keine signifikante Veränderung der Expression und rote Punkte eine signifikant erhöhte Expression in der anti-miR-29a-3p-Gruppe jeweils verglichen mit der scrambled Kontrollgruppe. C stellt die Daten für die direkt injizierten Mausjungen dar, D beinhaltet die Ergebnisse der Jungtiere nach maternalen Administration der anti-miR-29a-3p.

Um einem Eindruck über einen möglichen Einfluss durch veränderte microRNA-Expressionen auf die allgemeine Entwicklung und das Wachstum der Mausjungtiere zu bekommen, wurden diese vor der Organentnahme gewogen.

Hierbei zeigten sich an P1 keine signifikanten Unterschiede der Gewichte zwischen den scrambled und antimiR Gruppen in keiner der Versuchsanordnungen (jeweils maternale Administration intravenös mit 25/100 mg/kg KG oder intraperitoneal mit 25 mg/kg KG; Abbildung 12A).

An P7 hingegen waren die Mausjungen in allen antimiR Gruppen teils deutlich leichter als in den jeweiligen Kontrollgruppen, dies traf sowohl für die maternale als auch die direkte Verabreichung der Testsubstanzen zu (Abbildung 12B). Weitere 7 Tage später waren signifikante Unterschiede nur noch in den beiden Gruppen maternaler Administration in der niedrigeren Dosis (25 mg/kg KG i.p./i.v.) messbar (Abbildung 12C).



**Abbildung 12: Einfluss der anti-miR-29a-3p Behandlung auf das postnatale Wachstum der Mausjunges.** Dargestellt ist das Gewicht von Mausjunges am 1. (P1; A), 7. (P7; B) und 14. (P14; C) Tag nach Geburt, deren Mütter am 17. Schwangerschaftstag (E17) eine intravenöse (i.v.; 25 oder 100 mg/kg KG) oder intraperitoneale (i.p.; 25 mg/kg KG) Injektion mit anti-miR-29a-3p (ausgefüllte Kreise) oder einer scrambled Kontrollsequenz (leere Kreise) erhalten hatten. Außerdem ist das Gewicht von Mausjunges am 7. (P7; B) und 14. (P14; C) postnatalen Tag aufgetragen, die am Tag ihrer Geburt intraperitoneal (i.p.; 25 mg/kg KG) mit anti-miR-29a-3p (ausgefüllte Kreise) oder einer scrambled Kontrollsequenz (leere Kreise) injiziert wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert der Gewichte in Gramm ± SD angegeben.

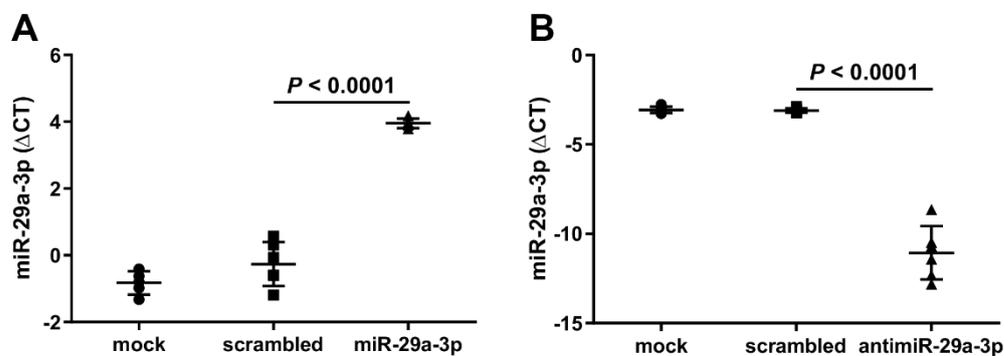
n = 5-6 pro Gruppe. Zum Vergleich der Mittelwerte aus der anti-miR-29a-3p und der Kontrollgruppe wurde der ungepaarte Student's *t*-Test angewendet. (\*)  $P < 0,05$ ; (\*\*)  $P < 0,01$ ; (\*\*\*\*)  $P < 0,0001$ .

## 4.7 Inkubation von NIH/3T3 Fibroblasten mit anti-miR-29a-3p oder einem miR-29a-3p mimic *in vitro*

Nach den *in vivo* Untersuchungen bezüglich miR-29a-3p und der anti-miR-29a-3p Applikation sollten die gewonnenen Erkenntnisse auch *in vitro* analysiert werden. NIH/3T3 Mausfibroblasten wurden hierzu in einem ersten Schritt mit einem synthetischen miR-29a-3p mimic, einer scrambled Kontrollsequenz oder keinem Reagenz (mock) inkubiert.

Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde die miR-29a-3p Expression in den jeweiligen Gruppen untersucht und es zeigte sich wie erwartet eine erhöhte Expression in der mimic Gruppe.

Der Versuch wurde mit anti-miR-29a-3p statt dem miR-29a-3p mimic wiederholt und auch hier zeigte sich wie erwartet äquivalent eine verminderte miR-29a-3p Expression in den Fibroblasten.



**Abbildung 13: Anwendung eines synthetischen miR-29a-3p mimic und von anti-miR-29a-3p *in vitro*.** NIH/3T3 Fibroblasten wurden entweder mit einer synthetischen Kontrollsequenz, synthetischer miR-29a-3p, anti-miR-29a-3p oder mock transfiziert. Die Transfektion lief jeweils über 48 Stunden und bei einer Konzentration der Testsubstanzen von 80 nM. Mittels real-time RT-PCR wurden dann die RNA Pools der NIH/3T3 Zellen auf miR-29a-3p nach Behandlung mit synthetischer miR-29a-3p (A) oder anti-miR-29a-3p (B) untersucht. Die Ergebnisse sind als gemittelter  $\Delta Ct$ -Wert  $\pm$  SD angegeben.  $n = 3-6$  separate Transfektionen pro Gruppe, jedes Symbol repräsentiert eine Transfektion, wobei einige Symbole überlagert sein können.  $\Delta Ct = Ct(Rnu6) - Ct(miR-29a-3p)$ . Die Mittelwerte wurden zwischen den Versuchsgruppen mittels one-way ANOVA mit einem Tukey's *post hoc* Test verglichen. Die *P*-Werte sind für scrambled versus miR bzw. anti-miR dargestellt.

## 4.8 Validierung von *Eln* und *Adamts7* als Ziele von miR-29a-3p

Im nächsten Schritt sollten mögliche Ziel-mRNA der microRNA-29a-3p ausfindig gemacht werden.

Mögliche Zielgene wurden dazu mittels *in silico* Analyse aus der targetscan Onlinedatenbank (TargetScanHuman Version 7.2, [www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) entnommen.

Zielgen	Genname	Konservierte Bindungsstellen				Schwach konservierte Bindungsstellen				
		total	8mer	7mer-m8	7mer-A1	total	8mer	7mer-m8	7mer-A1	6mer
<i>TET3</i>	tet methylcytosine dioxygenase 3	7	2	4	1	3	0	2	1	5
<i>TET1</i>	tet methylcytosine dioxygenase 1	4	0	3	1	0	0	0	0	1
<i>COL1A1</i>	collagen, type I, alpha 1	3	1	0	2	0	0	0	0	0
<i>ELN</i>	elastin	3	2	1	0	0	0	0	0	0
<i>COL4A5</i>	collagen, type IV, alpha 5	2	2	0	0	1	1	0	0	0
<i>ATAD2B</i>	ATPase family, AAA domain containing 2B	3	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>TET2</i>	tet methylcytosine dioxygenase 2	4	2	2	0	1	0	1	0	0
<i>ADAMTS17</i>	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, 17	2	1	1	0	1	0	0	1	4
<i>ADAMTS7</i>	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, 7	1	0	0	1	0	0	0	0	0

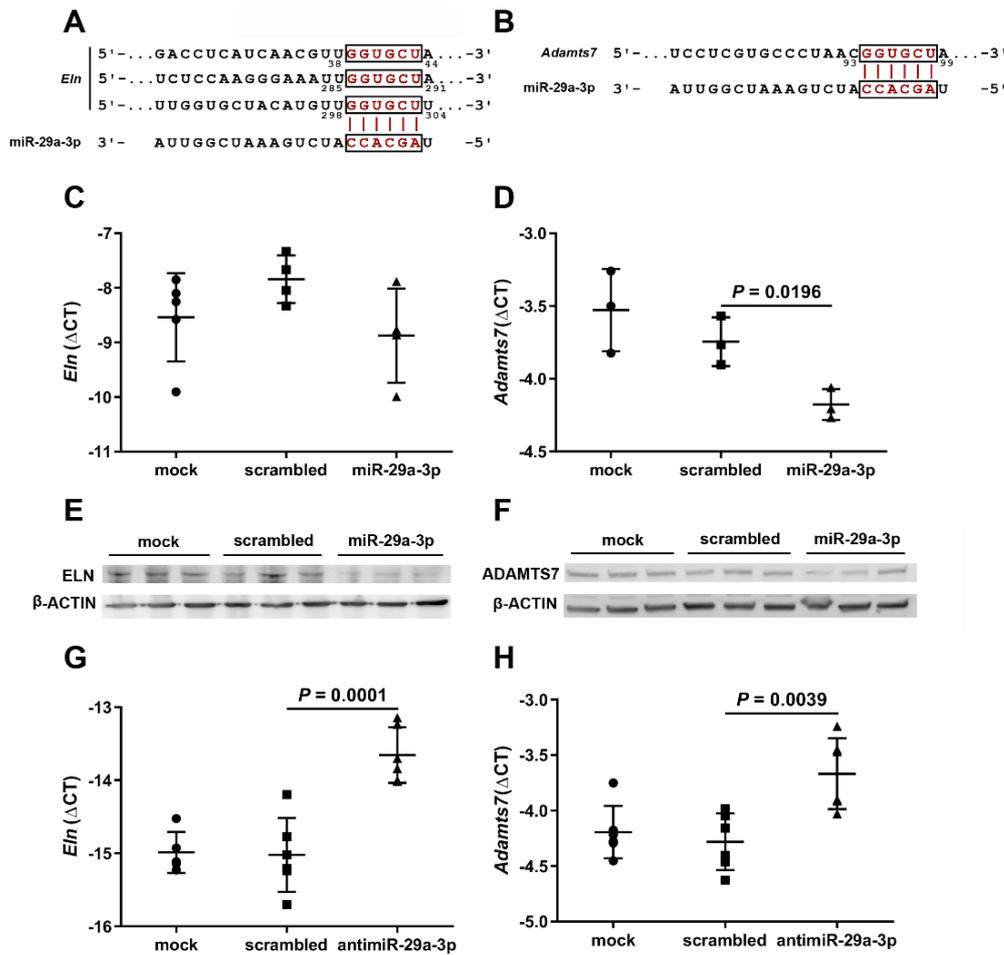
**Tabelle 18: Auszug aus der targetscan Online Datenbank für miR-29a-3p.** Mögliche Zielgene der miR-29a-3p wurden der Online Datenbank targetscan (Version 7.2, [www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) entnommen. Dargestellt ist jeweils die Anzahl der Bindungsstellen für das entsprechende Zielgen. Die gezeigte Auflistung entspricht nicht der Chronologie der targetscan Datenbank.

NIH/3T3 Fibroblasten wurden mit einer synthetischen microRNA-29a-3p, einer scrambled Kontrollsequenz, keinem Reagenz (mock) oder antimiR-29a-3p transfiziert und anschließend RNA bzw. Proteine aus ihnen isoliert. Die Genexpression, der durch *in silico* Analyse vorhergesagten Zielgene, wurde dann mittels qRT-PCR analysiert, für die Untersuchung der Proteinexpressionen wurden Western Blots durchgeführt.

Von den vorhergesagten Ziel-mRNA konnten *Eln* (kodiert Elastin, *ELN*) und *Adamts7* (kodiert die A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, motif 7,

*ADAMTS7*) validiert werden, wobei die *Eln* 3' -untranslated region (UTR) drei (8mer34-44, 8mer 285-291, 7mer-m8 298-304, Abbildung 14A) mögliche Bindungsstellen und die *Adamts7* mRNA 3'-untranslated region (UTR) nur eine (7mer-A193-99, Abbildung 14B) mögliche Bindungsstelle enthält. Für *Eln* konnte ein signifikanter Effekt auf die Genexpression nur im Western Blot, nicht in der qRT-PCR gezeigt werden (Abbildung 14C und E). In der qRT-PCR zeigte sich zwar eine tendenziell niedrigere *Eln*-Expression in den mit miR-29a-3p behandelten Zellen, der Unterschied, verglichen mit der Kontrollgruppe, war jedoch nicht statistisch signifikant. Bei *Adamts7* hingegen konnte ein signifikanter Effekt auf mRNA- und Proteinebene festgestellt werden (Abbildung 14D und F).

In Zellen, die mit anti-miR-29a-3p transfiziert wurden, zeigte sich entsprechend eine Zunahme der Expression von *Eln* und *Adamts7* auf mRNA-Ebene verglichen mit der scrambled Kontrollgruppe (Abbildung 14G und H). Hier war der Effekt bei beiden Zielgenen auch statistisch signifikant.



**Abbildung 14: *In vitro* Validierung von *Eln* und *Adamts7* als Ziele von miR-29a-3p in NIH/3T3 Fibroblasten.** NIH/3T3 Fibroblasten wurden entweder mit einer synthetischen scrambled microRNA, synthetischer miR-29a-3p, anti-miR-29a-3p oder mock transfiziert. Die Transfektion lief jeweils über 48 Stunden und bei einer Konzentration der Testsubstanzen von 80 nM. Die *in silico* Analyse lieferte *Eln* (Elastin; A) und *Adamts7* (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, motif 7; B) mRNA als mögliche Ziele der miR-29a-3p. Der RNA-Pool von mit synthetischer miR-29a-3p transfizierten Zellen wurde mittels real-time RT-PCR auf die Expression von *Eln* (C) und *Adamts7* (D) untersucht. Proteinextrakte der NIH/3T3 Zellen wurden im Immunoblot auf die Proteinexpressionslevel von *ELN* (E) und *ADAMTS7* (F) untersucht,  $\beta$ -ACTIN wurde hier als Ladungskontrolle verwendet. Außerdem wurde durch real-time RT-PCR der RNA Pool anti-miR-29a-3p transfizierter Zellen auf die Expression von *Eln* (G) und *Adamts7* (H) untersucht. Für die real-time RT-PCR Studien sind die Ergebnisse als gemittelter  $\Delta$ Ct-Wert  $\pm$  SD angegeben. n = 3-6 separate Transfektionen pro Gruppe, jedes Symbol repräsentiert eine Transfektion, wobei einige Symbole überlagert sein können. Für die mRNA Experimente gilt  $\Delta$ Ct = Ct(*Polr2a*) – Ct(jeweilige mRNA). Die Mittelwerte wurden zwischen den Versuchsgruppen mittels one-way ANOVA mit einem Tukey's *post hoc* Test verglichen. Die P-Werte sind für scrambled versus miR bzw. anti-miR dargestellt. Für die Immunoblots wurden Proteinextrakte von drei mock-, drei scrambled- und drei miR-29a-3p-Transfektionen nebeneinander auf dem gleichen Gel aufgetragen.

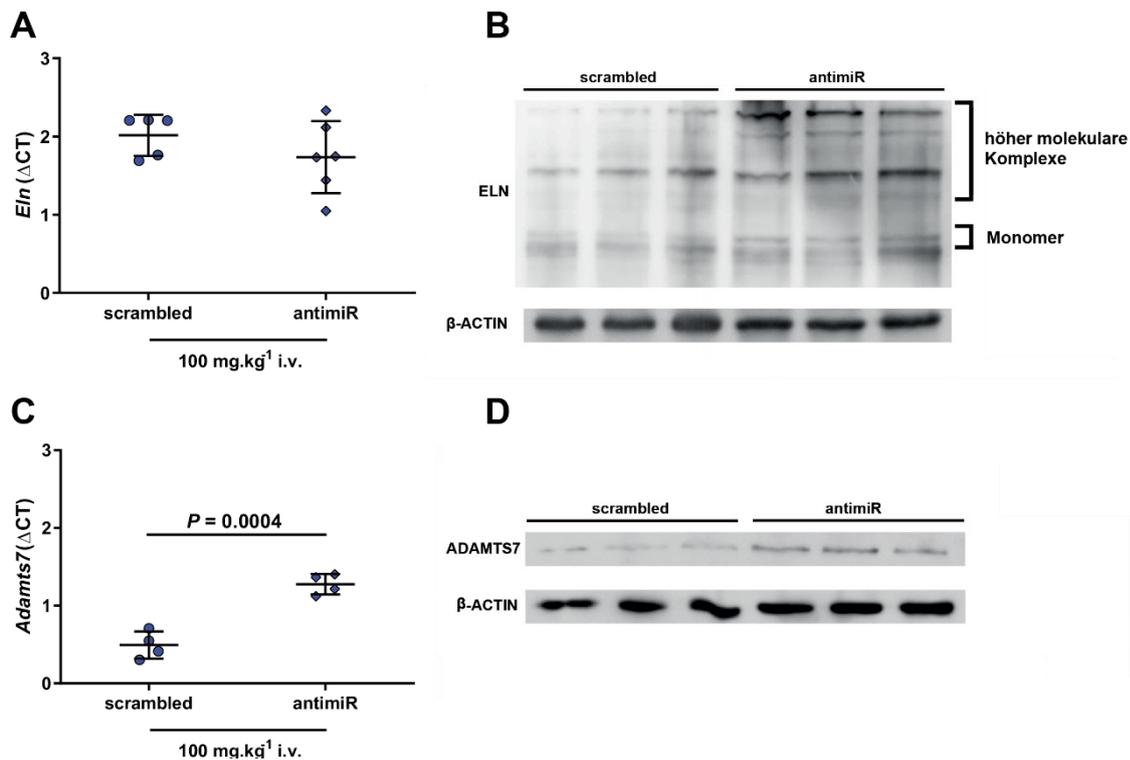
## 4.9 AntimiR-29a-3p erhöht bei maternalen Applikation *in vivo* die Expression der miR-29a-3p Ziele auch beim Nachwuchs

Die Expression der zuvor *in vitro* validierten Zielgene der miR-29a-3p sollte auch in den Geweben der Mausjungtiere untersucht werden, deren Mütter zuvor eine antimiR-29a-3p Injektion erhalten hatten.

Hierzu wurden exemplarisch die Lebern von Mausjungen, deren Mütter zuvor eine intravenöse Injektion mit antimiR-29a-3p oder einer scrambled Kontrollsequenz in einer Dosis von 100 mg/kg KG erhalten hatten ausgewählt, da in Lebergewebe in den Vorversuchen der stärkste antimiR Effekt auf die miR Expression beobachtet werden konnte. Nach RNA- bzw. Proteinisolierung wurde die Expression von *Eln* und *Adamts7* auf Protein und mRNA-Level analysiert.

Wie in den *in vitro* Untersuchungen nach Behandlung mit synthetischer miR-29a-3p zeigte sich keine verstärkte *Eln* Expression auf mRNA-Ebene, hingegen war eine deutliche Zunahme der Proteinkonzentration im Western Blot erkennbar (Abbildung 15A und B).

Bei *Adamts7* fand sich ebenfalls analog zu den *in vitro* Versuchen eine vermehrte Expression auf mRNA- und Proteinebene (Abbildung 15C und D), sodass zusammenfassend die Ergebnisse der Untersuchungen an Fibroblasten auch *in vivo* bestätigt werden konnten.



**Abbildung 15: Maternale Transmission von anti-miR-29a-3p auf Mausjungtiere führt zu vermehrter Expression der miR-29a-3p Zielgene in den Jungtieren.** Schwangere Mäuse erhielten am 17. Schwangerschaftstag (E17) eine intravenöse Injektion (100 mg/kg KG) anti-miR-29a-3p (Diamanten) oder eine scrambled Kontrollsequenz (Kreise). Die Lebern der nachfolgend geborenen Jungtiere wurden am 7. postnatalen Tag (P7) entnommen. Mit einer real-time RT-PCR wurde die Expression der miR-29a-3p Zielgene *Eln* (Elastin; A) und *Adamts7* (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, motif 7; C) untersucht. Dargestellt ist jeweils der gemittelte  $\Delta\text{Ct}$ -Wert  $\pm$  SD,  $n = 4-6$  Tiere pro Gruppe, jedes Symbol repräsentiert ein Tier, wobei einige Symbole überlagert sein können.  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{Polr2a}) - \text{Ct}(\text{jeweilige mRNA})$ . Die Mittelwerte wurden zwischen den Versuchsgruppen mittels Student's ungepaartem  $t$ -Test verglichen. Die  $P$ -Werte sind bei  $P < 0,05$  angegeben. Proteinextrakte aus der Leber von Mausjungern an P7 wurden mit einem Immunoblot auf die Proteinexpression von *ELN* (B) und *ADAMTS7* (D) untersucht,  $\beta$ -ACTIN wurde hier als Ladungskontrolle verwendet. Für die Immunoblots wurden Proteinextrakte von drei scrambled anti-miR- und drei anti-miR-29a-3p behandelten Mäusen nebeneinander auf dem gleichen Gel aufgetragen.

## 5 DISKUSSION

Trotz ihrer noch recht jungen Geschichte werden microRNAs mittlerweile als entscheidende Regulatoren in sowohl physiologischen als auch pathologischen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen angesehen. Zahlreiche miRs wie miR-1, miR-19a, miR-23a, miR-26, miR-31, miR-101, miR-130 haben allgemein Transkriptionsfaktoren, Tumorsuppressorgene oder Wachstumsfaktoren als Zielgene [5, 59]. Auf neuronaler Ebene werden wesentliche Differenzierungsprozesse durch miR-124, das miR-17 Cluster (bestehend aus den miR-Familien 17, 18, 19 und 92) und die neuronenspezifische miR-9 beeinflusst [14, 92], pulmonal ist miR-489 an der Regulation der alveolaren Septierung beteiligt [76]. In der perinatalen Phase zeigen miR-379/miR-410 defiziente Mäuse eine generelle metabolische Adaptionsstörung [53] und bei der ebenfalls in dieser Periode auftretenden bronchopulmonalen Dysplasie zeigen sich verminderte Expressionen unter anderem von miR-17/miR-92 und miR-29b [24, 73, 84, 86] um nur einige Beispiele der von microRNAs beeinflussten Prozesse zu nennen.

Zur Untersuchung der einzelnen microRNAs ist es von zentraler Bedeutung ihre Funktion möglichst spezifisch inhibieren zu können. Dies ist zum Beispiel durch konventionelle Knock-Out Verfahren einzelner Gene der untersuchten Tiere möglich. Oftmals ist aber besonders bei der Betrachtung von Entwicklungsvorgängen auch eine zeitlich spezifische Hemmung eines Prozesses nötig, weshalb bisher häufig Genmodulationssysteme mit speziellen Induktionssubstanzen zum Einsatz kommen.

Bei diesen Substanzen handelt es sich meist um Tamoxifen oder Tetracyclinderivate wie Doxycyclin. Für all diese Substanzen konnten allerdings ebenfalls Einflüsse auf Differenzierungsprozesse nachgewiesen werden, sodass hierdurch die Untersuchung von Entwicklungsprozessen erschwert und die Aussagekraft etwaiger Untersuchungsergebnisse möglicherweise beeinflusst wird.

Tamoxifen führt zu reduzierter Gewichtszunahme der neugeborenen Mäuse, reduziert das totale Lungenvolumen (TLC) und somit die Gasaustauschfläche. Ebenfalls erhöht Tamoxifen in höheren Dosen das Abortrisiko und führt bei erwachsenen Mäusen zur Erhöhung des Blutdrucks [27, 82]. Bei Ratten weisen Feten von mit Tamoxifen behandelten Muttertieren geringere Geburtsgewichte auf [26]. Im Bereich der Humanmedizin gilt eine Schwangerschaft als absolute Kontraindikation für die Einnahme von Tamoxifen, da die Substanz teratogen ist und zu einer signifikanten Verlängerung der Schwangerschaft führt [15, 26]. Nach Tamoxifen Einnahme wird daher eine

zweimonatige konsequente Verhütung empfohlen, da es bereits mehrfach zu Fällen fetaler Anomalien in Zusammenhang mit der Einnahme von Tamoxifen gekommen ist [10]. Ebenso erhöht die Einnahme von Tamoxifen das Risiko tiefer Venenthrombosen, pulmonaler Embolien und von Schlaganfällen [9].

Tetracycline sind beim Menschen während der Schwangerschaft ebenfalls kontraindiziert [71]. Speziell für Doxycyclin, welches häufig als Induktionssubstanz eingesetzt wird, konnten plazentare Anomalien, Affektion fetaler Entwicklungsprozesse, eine Inhibierung sowohl der Angiogenese, als auch der Lungenalveolarisierung und eine allgemeine Hemmung der Kollagenase Aktivität nachgewiesen werden [31, 38, 69, 79, 98]. Bei höheren Dosierungen kommt es zum Entwicklungsstillstand der Feten oder zur kompletten Resorption des Selbigen [69].

Eine weitere etablierte Möglichkeit der microRNA Inhibition sind antimiRs. Dabei handelt es sich um synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die spezifisch die Funktion, der für sie vorgesehenen microRNA inhibieren können. AntimiRs können praktisch für jede microRNA passend synthetisiert werden und wurden bereits in zahlreichen Studien zur microRNA Inhibition angewandt.

Speziell bei der Untersuchung von microRNAs in der perinatalen und frühen postnatalen Phase bereiten bei der Verwendung von antimiRs aber häufig die geringe Tiergröße und das geringe Gewicht Probleme, da daraus resultierende kleine Injektionsvolumina die korrekte Dosierung der zu verabreichenden antimiR deutlich erschweren. Auch die teils an mehreren postnatalen Tagen durchzuführenden Injektionen selbst stellen für die kleinen Jungtiere ein verhältnismäßig großes Trauma dar, dessen Einfluss nur schwer abschätzbar ist. Es konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass selbst die Injektion von Nuklease freiem Wasser bei neugeborenen Mäusen zu langsamerer Gewichtszunahme und reduziertem Mean linear intercept (MLI) sowie Volumen der Lunge, verglichen mit nicht injizierten Mäusen, führt [27].

Aus der postnatalen Injektion der antimiRs resultiert logischerweise, dass kein Einfluss auf pränatale, perinatale oder frühe postnatale Prozesse genommen werden kann, was hingegen bei konventionellen Genmodulationssystemen möglich ist.

All diese Überlegungen haben zur Durchführung der vorliegenden Arbeit geführt, in der untersucht werden sollte, ob durch maternale Applikation einer antimiR ein messbarer Effekt auf die frühe postnatale microRNA Expression der Folgegeneration ohne Nutzung von Induktionsagenzien oder Injektionen an den Neugeborenen selbst erzielt werden kann.

Für diese methodische Arbeit wurde die microRNA-29a-3p gewählt, da microRNA-29a-3p defiziente Mäuse trotzdem lebens- und fortpflanzungsfähig sind [78]. Somit war von einer geringen Beeinflussung der allgemeinen Gesundheit und Fortpflanzungsfähigkeit der Versuchstiere auszugehen.

Zunächst sollte der Effekt einer anti-miR-29a-3p Applikation bei direkter intraperitonealer Injektion am 1. postnatalen Tag untersucht werden. Dies ist die übliche Applikationsform bei den Mausjungtieren, da hier eine intravenöse Gabe aufgrund der geringen Größe ausscheidet. Um mögliche Unterschiede in der Verteilung der anti-miR aufzeigen zu können, wurde Gewebe aus Herz, Hirn, Niere, Leber und Lunge untersucht. Für Hirngewebe ging man ursprünglich davon aus, dass anti-miRs die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können [51]. Auch mittels Doxycyclin oder Tetracyclin basierter Systeme kann Hirngewebe schwieriger erreicht werden, da die Induktionssubstanzen dort in niedrigerer Konzentration vorliegen [17, 62].

Am 7. postnatalen Tag zeigte sich in allen Organen eine deutliche Reduktion der miR-29a-3p Expression, der Effekt war im Hirngewebe zwar am schwächsten ausgeprägt, mit einem *P*-Wert von  $< 0,01$  aber immer noch deutlich signifikant. Zumindest für anti-miR-29a-3p kann also von einer Passierbarkeit der Blut-Hirn-Schranke ausgegangen werden. Sieben weitere Tage später war im Hirngewebe kein signifikanter Unterschied in der miR-29a-3p Expression mehr messbar, in allen anderen Organen eine Abschwächung der Wirkung erkennbar. Hierzu sei erwähnt, dass sich das Gewicht der Mäuse innerhalb dieser sieben Tage circa verfünffacht, es somit also zu einer starken Verdünnung der anti-miR und folglich zu geringeren Wirkspiegeln kommt.

Eine einzelne intraperitoneale anti-miR-29a-3p Applikation am Tag der Geburt führte also mit Ausnahme des Hirngewebes in den anderen untersuchten Organen Niere, Leber, Lunge und Herz zu einer auch an P14 signifikanten Reduktion der miR-29a-3p Expression.

Für die maternale Applikation war im nächsten Schritt von besonderer Relevanz, ob bereits am ersten postnatalen Tag ein Effekt auf den microRNA Pool der Jungtiere nachweisbar ist und wie stark insgesamt die Reduktion der miR-29a-3p Expression verglichen mit der direkten Injektion ausfällt. Die Untersuchungszeitpunkte wurden also um diesen Tag (P1) ergänzt, der bei direkter Injektion nicht realisierbar ist. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde zunächst die Injektionsdosis aus der direkten Injektion mit 25 mg/kg KG übernommen. Als weiterer Einflussfaktor auf die anti-miR Verteilung wurde der Applikationsweg angesehen. Einerseits erfolgt eine intraperitoneale Injektion bei den schwangeren Versuchstieren in unmittelbarer Nähe der später zu

untersuchenden Jungtiere. Anders als bei diesen ist jedoch bei den deutlich größeren Muttertieren auch eine intravenöse Verabreichung über die Schwanzvene möglich, die dann für eine insgesamt gleichmäßigere systemische Verteilung der Substanz sorgen könnte. Auch die intravenöse Injektion in gleicher Dosis wurde somit für die maternalen Untersuchungen durchgeführt.

Insgesamt war der Effekt auf die miR-29a-3p Expression der Jungtiere nach maternaler Applikation von 25 mg/kg KG anti-miR intravenös oder intraperitoneal deutlich schwächer und inkonsistenter als bei direkter Injektion. Nach intravenöser Verabreichung konnte ein signifikanter Effekt an P1, P7 und P14 im Lebergewebe nachgewiesen werden. Dieser ist möglicherweise durch das hohe Blutvolumen und die gute Gefäßversorgung dieses Organs zu begründen und würde somit die These einer besseren systemischen Verteilung der anti-miR bei intravenöser Verabreichung unterstützen. Bei intraperitonealer Injektion konnte ein solcher Effekt im Lebergewebe an keinem der drei Zeitpunkte gezeigt werden. Hier trat eine signifikante Änderung dafür an allen Untersuchungszeitpunkten im Nierengewebe auf.

Passend zu der bereits bei direkter Injektion schwach ausgeprägten Veränderung im Hirngewebe war bei maternaler Verabreichung in keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied der miR-29a-3p Expression nachweisbar.

Die Daten der jeweiligen Muttertiere zeigten ein ähnliches Bild wie die Jungtiere nach direkter Injektion, wobei hier aufgrund der geringen Anzahl von Versuchstieren keine endgültigen Aussagen, sondern nur Tendenzen abzulesen waren. An P1 waren hier nur minimale Expressionsunterschiede erkennbar, möglicherweise erklärbar durch den geringeren Stoffwechsel und Zellumsatz der erwachsenen Muttertiere verglichen mit ihren Nachkommen, sodass hier die anti-miR zwar im Gewebe vorlag, in dieser Dosis der Abstand zwischen Injektion und Untersuchungszeitpunkt aber zu kurz war, um einen sichtbaren Effekt auf die microRNA-Expression zu erwirken. Von P7 zu P14 wurde der Effekt auf die microRNA-Expression zwischen anti-miR- und Kontrollgruppe dann in allen Organen und beiden Injektionswegen größer, da hier der Abstand zur Injektion möglicherweise trotz trägerer Stoffwechsellage groß genug für einen messbaren Unterschied war.

Insgesamt waren die Ergebnisse aus diesen Versuchen teils inkonsistent und die Reduktion der miR-29a-3p Expression schwächer ausgeprägt als bei direkter Injektion, sodass die Versuche mit einer deutlich höheren Dosis wiederholt wurden. Nach eingehender Betrachtung der Ergebnisse aus dem ersten Versuch und mit der bereits dargelegten Überlegung der besseren systemischen Verteilung, schienen die

Ergebnisse aus der intravenösen Gruppe vielversprechender, sodass diese Applikationsform weiterverfolgt wurde.

Wie erhofft fiel bei einer Injektionsdosis von 100 mg/kg KG die Reduktion der miR-29a-3p Expression insgesamt deutlich stärker, wenn auch nicht gleich stark wie bei direkter Injektion aus. Ebenfalls konsistent mit der direkten Injektion zeigte sich die stärkste Reduktion in allen untersuchten Geweben am frühesten Untersuchungszeitpunkt, in diesem Fall also P1. Dies ist wie oben beschrieben vermutlich auf die Verdünnung der antimiR während des Wachstums der Mäuse zu erklären. Bis P14 konnte trotzdem ein signifikanter Effekt in allen Organen nachgewiesen werden, mit Ausnahme des Gehirns, in dem sich der Effekt von P1 zu P7 abschwächte und an P14 nicht mehr signifikant war.

Interessanterweise konnte bei den Muttertieren bei dieser erhöhten Dosierung bereits eine deutlich verminderte Expression von miR-29a-3p an P1 gezeigt werden, sodass in Kombination mit dem geringeren Stoffwechsel wohl auch hier ähnlich wie bei den Jungtieren die Dosis für einen messbaren Effekt im ersten Versuch zu gering war. Die Ergebnisse an P7 und P14 zeigten sich dann konsistent zu denen aus dem ersten Versuch.

Um sicherzugehen, dass die gemessene Reduktion der miR-29a-3p Expression tatsächlich durch die maternal applizierte antimiR verursacht wurde und diese somit die Blut-Plazenta-Schranke passieren kann, wurden eine stem-loop PCR und eine *In-Situ* Hybridisierung durchgeführt. Durch beide Verfahren konnte der Nachweis erbracht werden, dass antimiR-29a-3p die Blut-Plazenta-Schranke passieren kann. Für die *In-Situ* Hybridisierung, die nachfolgende RNA-Sequenzierung und letztlich die Validierung der miR-29a-3p Zielgene *in vivo* wurde exemplarisch die Leber als sehr gut vaskularisiertes Organ gewählt, da der antimiR-29a-3p Effekt auf die miR-29a-3p Expression dort in den Voruntersuchungen am stärksten und konsistentesten ausgeprägt war.

Bei der Untersuchung möglicher Nebeneffekte der antimiR-29a-3p Gabe auf die Expression weiterer microRNAs neben miR-29a-3p erbrachte eine RNA-Sequenzierung von Lebergewebe direkt mit antimiR-29a-3p behandelter Mäuse eine signifikant veränderte Expression von 40 microRNAs. Für Lebergewebe maternal behandelte Mausjungtiere waren es am gleichen Untersuchungszeitpunkt immerhin noch 4 microRNAs. Auch für antimiRs, oder zumindest antimiR-29a-3p im Speziellen, muss also von einer Beeinflussung der Expression weiterer microRNAs neben der Ziel-

microRNA ausgegangen werden. Obwohl die in dieser Studie verwendete antimiR durch die LNA Modifikation bereits eine erhöhte Affinität zur Ziel-microRNA haben sollte [100].

Passend dazu ergab der Vergleich der Geburtsgewichte der Mausjungtiere zumindest am 7. postnatalen Tag bei sowohl maternaler als auch direkter antimiR Applikation signifikant verringerte Geburtsgewichte verglichen mit der scrambled Kontrollgruppe. Es scheint also durch die antimiR-29a-3p Behandlung zu einem entweder direkt durch miR-29a-3p oder andere der ebenfalls verändert exprimierten microRNAs zu einer Wachstumsverzögerung zu kommen. Sieben Tage später war ein solch signifikanter Gewichtsunterschied nur noch bei maternaler Applikation in der geringeren Dosisgruppe von 25 mg/kg KG nachweisbar, insgesamt aber mit geringer Gewichtsdifferenz als am 7. postnatalen Tag.

Besonders die sehr deutlichen Gewichtsunterschiede an P7 bei direkter antimiR Applikation und maternaler Verabreichung in der erhöhten Dosierung von 100 mg/kg KG, also den Gruppen mit nach miR-29a-3p Expression deutlich stärkerer antimiR Wirkung, hatten sich an P14 normalisiert. Über die Ursachen dieser Beobachtungen lässt sich mit den vorhandenen Daten und aufgrund der Komplexität allgemeiner Wachstumsprozesse keine definitive Aussage treffen. Vergleicht man die Gewichte der direkt injizierten Mäuse mit denen bei maternaler Applikation, scheint das reine Trauma durch die Injektion bei den direkt injizierten Mäusen im vorliegenden Versuch zu keiner relevanten allgemeinen Wachstumsverzögerung geführt zu haben, da zwischen den einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede messbar waren.

Im nächsten Schritt sollte der Effekt der antimiR-29a-3p Applikation nicht nur auf die miR-29a-3p Expression, sondern auch deren Zielgene beurteilt werden. Hierzu wurde zunächst eine *in silico* Analyse möglicher Ziele der miR-29a-3p vorgenommen und in fragelkommende Gene dann auf mRNA- und Proteinebene *in vitro* untersucht. In NIH/3T3 Fibroblasten konnten *Eln* und *Adamts7* als Ziele der miR-29a-3p verifiziert werden. Von einer vermehrten *Adamts7* Expression und damit einhergehender Kalzifizierung von glatten Muskelzellen in Blutgefäßen war nach miR-29 Inhibition bereits berichtet worden [22]. Auch für *Eln* und miR-29 konnten bereits Interaktionen gezeigt werden, so wird neben miR-15 auch miR-29 als Mediator der postnatalen Aortenentwicklung und der dabei abnehmenden *Eln* Expression angesehen [77, 112].

Grundsätzlich wurde nach der Entdeckung der microRNAs zunächst angenommen, dass diese in Pflanzen vor allem über eine Destabilisierung der mRNA zu einer verminderten Expression der Zielproteine führen. Bei Tieren hingegen war vor allem von einer Hemmung der Translation und somit keiner Beeinflussung der mRNA Expression

ausgegangen worden. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass beide Varianten sowohl in tierischen als auch pflanzlichen Organismen prinzipiell vorkommen können [3, 40, 47, 105]. Demnach war bei der Untersuchung der Maus Fibroblasten vor allem von einer verminderten Proteinexpression der Zielgene nach Behandlung mit synthetischer miR-29a-3p auszugehen. Dies war bei ELASTIN der Fall. Hier zeigte sich eine verminderte Proteinexpression bei gleichzeitig zwar tendenziell niedrigerer, aber nicht signifikant veränderter mRNA Expression. Für *Adamts7* hingegen war eine verminderte Expression sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene zu beobachten, was nochmals unterstreicht, dass microRNAs auch in der Tierwelt prinzipiell durch Beeinflussung beider Ebenen die Zielgen Expression regulieren können. In mit anti-miR-29a-3p behandelten Fibroblasten konnte eine vermehrte Expression der Ziel-mRNA *Eln* und *Adamts7* nachgewiesen werden, diese war in beiden Fällen statistisch signifikant.

Nachfolgend konnten diese Ergebnisse aus den *in vitro* Untersuchungen in Lebergewebe der maternal mit anti-miR-29a-3p behandelten Jungtiere bestätigt werden. Für ELASTIN zeigte sich eine vermehrte Expression auf Proteinebene, für *Adamts7* sowohl auf Protein-, als auch mRNA Ebene.

Zusammenfassend kann somit die methodische Fragestellung der vorliegenden Arbeit, ob eine maternal verabreichte anti-miR zu einer Verminderung der Expression der Ziel-microRNA und deren Zielgene bei den Jungtieren führt, zumindest für miR-29a-3p und die entsprechende anti-miR bejaht werden.

Als Alternative zu bereits etablierten Genmodulationssystemen bietet diese Methodik sowohl Vor- als auch Nachteile. Zum einen ist somit bereits eine pränatale oder sehr frühe postnatale Beeinflussung der microRNA Expression möglich. Zusätzlich kann über den Injektionszeitpunkt eine recht genaue Terminierung der microRNA Inhibition erreicht werden, somit können zu untersuchende Entwicklungsprozesse zu wählbaren Zeitpunkten beeinflusst werden. Auch für Untersuchungen von unmittelbar postnatal ablaufenden Prozessen bietet diese Methodik somit neue Optionen. Gleichzeitig ist dieser Vorteil ohne ein direktes Trauma für die Jungtiere zu erzielen, da an diesen keine Injektionen nötig sind. Die Problematik der richtigen Dosierung der verwendeten Substanzen aufgrund der kleinen Applikationsvolumina und der kleinen Tiergröße können somit demnach ebenfalls umgangen werden. Auch mögliche Nebeneffekte bei den Mausjungtieren, die allein durch die nötigen Injektionen an sich und das damit verbundene Trauma entstehen, können vermieden werden. Wenngleich die gezeigten Daten bezüglich der Mausgewichte teils signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen aufweisen, und somit auch hier von einem Einfluss auf die

Entwicklung und das Wachstum auszugehen ist, der dann aber – wie bei konventioneller Genmodulation auch – vom jeweiligen Zielgen abhängt.

Im Vergleich zu herkömmlichen Genmodulationsstrategien kann bei Verwendung von antimiRs auf die Verwendung von Induktionsagenzien wie Doxycyclin oder Tamoxifen verzichtet werden, die ihrerseits unerwünschte Nebeneffekte auf Differenzierung und Entwicklung der Jungtiere haben können.

Andererseits beziehen sich die vorliegenden Daten im Sinne eines zunächst methodischen Möglichkeitsnachweises nur auf microRNA-29a-3p. Für andere microRNAs oder auch andere Versuchstierspezies müssten entsprechend erneut umfangreiche Voruntersuchungen durchgeführt werden, inklusive Festlegung einer entsprechenden antimiR Dosierung für die jeweilige Ziel microRNA.

Außerdem haben die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung gezeigt, dass auch eine vermeintlich hoch spezifische antimiR Nebeneffekte auf andere microRNAs haben kann. Dies wiederum könnte erneut mit möglichen unerwünschten Beeinflussungen von Differenzierungsprozessen einhergehen, deren Ausmaß vor Erprobung an anderen microRNAs jeweils individuell zu bestimmen wäre. Bei Verwendung einer Knock-out Mauslinie kann hingegen explizit ein einzelnes Gen und somit z.B. eine einzelne microRNA ausgeschaltet werden. Allerdings ist hier keine Differenzierung der 3p und 5p Stränge möglich. Hingegen zielen antimiRs lediglich auf die Inhibition eines miR-Stranges, haben dann aber zumindest in Bezug auf microRNA-29 wegen der großen Sequenzähnlichkeit auch Einflüsse auf andere Mitglieder dieser microRNA Familie.

Ebenfalls ist mit der Verwendung von antimiRs bisher keine Gewebe- oder Zelltyp-spezifische Inhibition möglich, wohingegen dies mittels konventioneller Methodik möglich wäre.

Verglichen mit der Verwendung einer bereits etablierten Knock-out Mauslinie sind auch die Kosten der hier durchgeführten Versuche nicht zu unterschätzen. Diese liegen allein für die *in vivo* verwendeten LNA-Sequenzen bereits bei ca. 5.400 Euro. Für die Neuetablierung und Anzucht einer Knock-out Mauslinie sind Aufwand und Kosten natürlich entsprechend ebenfalls beträchtlich.

Zusammenfassend hat also sowohl die Verwendung von antimiRs als auch die Nutzung etablierter Genmodulationsstrategien, jeweils spezifische Vor- und Nachteile, sodass für zukünftige Untersuchungen jeweils abgewogen werden muss, welche spezifischen Anforderungen gegeben sind und mit welchem Ansatz diese besser zu erfüllen wären. In jedem Fall stellt die hier gezeigte Methodik aber eine potenziell neue Möglichkeit der

zeitlich gut steuerbaren Beeinflussung der microRNA Expression vor allem in der prä- und frühen postnatalen Periode dar.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Agarwal V, Bell GW, Nam Jin-Wu, Bartel DP. *Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs*. *ELife*, 2015.
2. Aguado-Fraile E, Ramos E, Conde E, et al. A Pilot Study Identifying a Set of microRNAs As Precise Diagnostic Biomarkers of Acute Kidney Injury. *PLOS One* 2015; **10**: 1-15.
3. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008; **455**: 64–71.
4. Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiology* 2003; **132**: 709–17.
5. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004; **116**: 281–97.
6. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; **136**: 215–33.
7. Bartoszewski R, Sikorski AF. Editorial focus: understanding off-target effects as the key to successful RNAi therapy. *Cellular & molecular biology letters* 2019; **24**: 69.
8. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 1995; **57**: 289–300.
9. Bernard Fisher, Joseph P. Costantino, D. Lawrence Wickerham, et al. Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute* 1998; **90**: 1371–88.
10. Braems G, Denys H, Wever O de, Cocquyt V, van den Broecke R. Use of tamoxifen before and during pregnancy. *The Oncologist* 2011; **16**: 1547–51.
11. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLOS Biology* 2005; **3**: 405-418.
12. Brock M, Samillan VJ, Trenkmann M, et al. AntagomiR directed against miR-20a restores functional BMPR2 signalling and prevents vascular remodelling in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *European Heart Journal* 2014; **35**: 3203–11.
13. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2005; **33**: 1-9.

14. Cho KHT, Xu B, Blenkiron C, Fraser M. Emerging Roles of miRNAs in Brain Development and Perinatal Brain Injury. *Frontiers in Physiology* 2019; **10**: 227.
15. Cunha GR, Taguchi O, Namikawa R, Nishizuka Y, Robboy SJ. Teratogenic effects of clomiphene, tamoxifen, and diethylstilbestrol on the developing human female genital tract. *Human Pathology* 1987; **18**: 1132–43.
16. Cushing L, Kuang PP, Qian J, et al. miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2011; **45**: 287–94.
17. Das AT, Tenenbaum L, Berkhout B. Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Current Gene Therapy* 2016; **16**: 156–67.
18. Del Monroig-Bosque PC, Rivera CA, Calin GA. MicroRNAs in cancer therapeutics: "from the bench to the bedside". *Expert Opinion on Biological Therapy* 2015; **15**: 1381–5.
19. Deng Z, He Y, Yang X, et al. MicroRNA-29: A Crucial Player in Fibrotic Disease. *Molecular Diagnosis & Therapy* 2017; **21**: 285–94.
20. Divisato G, Passaro F, Russo T, Parisi S. The Key Role of MicroRNAs in Self-Renewal and Differentiation of Embryonic Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; **21**: 1–21.
21. Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, Sharma A, Dreyfuss G. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA* 2003; **9**: 180–6.
22. Du Y, Gao C, Liu Z, et al. Upregulation of a Disintegrin and Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs-7 by miR-29 Repression Mediates Vascular Smooth Muscle Calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2012; **32**: 2580–8.
23. Duan Z-Y, Cai G-Y, Li J-J, et al. U6 can be used as a housekeeping gene for urinary sediment miRNA studies of IgA nephropathy. *Scientific reports* 2018; **8**: 1–7.
24. Durrani-Kolarik S, Pool CA, Gray A, et al. miR-29b supplementation decreases expression of matrix proteins and improves alveolarization in mice exposed to maternal inflammation and neonatal hyperoxia. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 2017; **313**: 339-349.
25. Elmén J, Lindow M, Schütz S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008; **452**: 896–9.
26. Fang X, Wong S, Mitchell BF. Relationships among Sex Steroids, Oxytocin, and Their Receptors in the Rat Uterus during Late Gestation and at Parturition. *Endocrinology* 1996; **137**: 3213–9.

27. Fehl J, Pozarska A, Nardiello C, et al. Control Interventions Can Impact Alveolarization and the Transcriptome in Developing Mouse Lungs. *Anatomical Record* 2019; **302**: 346–63.
28. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1997; **237**: 752–7.
29. Frost RJA, van Rooij E. miRNAs as therapeutic targets in ischemic heart disease. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 2010; **3**: 280–9.
30. Gallo Cantafio ME, Nielsen BS, Mignogna C, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of a 13-mer LNA-inhibitor-miR-221 in Mice and Non-human Primates. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 2016; **5**: 1–13.
31. Golub LM, Mc Namara TF, D'Angelo G, Greenwald RA, Ramamurthy NS. A Non-antibacterial Chemically-modified Tetracycline Inhibits Mammalian Collagenase Activity. *Journal of Dental Research* 1987; **66**: 1310–4.
32. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; **89**: 5547–51.
33. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)* 1995; **268**: 1766–9.
34. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research* 2006; **34**: 140-144.
35. Han W, Han Y, Liu X, Shang X. Effect of miR-29a inhibition on ventricular hypertrophy induced by pressure overload. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2015; **71**: 821–6.
36. Hayashi S, McMahon AP. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental Biology* 2002; **244**: 305–18.
37. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics* 2004; **5**: 522–31.
38. Hosford GE, Fang X, Olson DM. Hyperoxia decreases matrix metalloproteinase-9 and increases tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 protein in the newborn rat lung: association with arrested alveolarization. *Pediatric Research* 2004; **56**: 26–34.
39. Hsu S-H, Delgado ER, Otero PA, et al. MicroRNA-122 regulates polyploidization in the murine liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2016; **64**: 599–615.

40. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews. Genetics* 2011; **12**: 99–110.
41. Iannaccone M, Dorhoi A, Kaufmann SHE. Host-directed therapy of tuberculosis: what is in it for microRNA? *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2014; **18**: 491–4.
42. Indra AK, Warot X, Brocard J, et al. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Research* 1999; **27**: 4324–7.
43. Ivey KN, Srivastava D. microRNAs as Developmental Regulators. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2015; **7**: 1-9.
44. Jackson AL, Levin AA. Developing microRNA therapeutics: approaching the unique complexities. *Nucleic Acid Therapeutics* 2012; **22**: 213–25.
45. Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England Journal of Medicine* 2013; **368**: 1685–94.
46. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews. Genetics* 2015; **16**: 421–33.
47. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews. Genetics* 2015; **16**: 421–33.
48. Kang K, Huang L, Li Q, et al. An improved Tet-on system in microRNA overexpression and CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2019; **10**: 1–12.
49. Krek A, Grün D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics* 2005; **37**: 495–500.
50. Krützfeldt J, Kuwajima S, Braich R, et al. Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. *Nucleic Acids Research* 2007; **35**: 2885–92.
51. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; **438**: 685–9.
52. Kuenne C, Preussner J, Herzog M, Braun T, Looso M. MIRPIPE: quantification of microRNAs in niche model organisms. *Bioinformatics* 2014; **30**: 3412–3.
53. Labialle S, Marty V, Bortolin-Cavallé M-L, et al. The miR-379/miR-410 cluster at the imprinted Dlk1-Dio3 domain controls neonatal metabolic adaptation. *The EMBO Journal* 2014; **33**: 2216–30.
54. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* 2001; **294**: 853–8.

55. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Current Biology* 2002; **12**: 735–9.
56. Le Y, Sauer B. Conditional gene knockout using cre recombinase. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2000; **17**: 477–85.
57. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; **75**: 843–54.
58. Lennox KA, Behlke MA. Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene therapy* 2011; **18**: 1111–20.
59. Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades M, W., Bartel DP, Burge C., B. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 2003; **115**: 787–98.
60. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development* 2003; **17**: 991–1008.
61. Liu D, Huang Y, Jia C, Li Y, Liang F, Fu Q. Administration of antagomir-223 inhibits apoptosis, promotes angiogenesis and functional recovery in rats with spinal cord injury. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2015; **35**: 483–91.
62. Lizen B, Claus M, Jeannotte L, Rijli FM, Gofflot F. Perinatal induction of Cre recombination with tamoxifen. *Transgenic Research* 2015; **24**: 1065–77.
63. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 2014; **15**: 1–21.
64. Lui Y, Dong H-Y, Zhang B, et al. miR-29a-3p Attenuates Hypoxic Pulmonary Hypertension by Inhibiting Pulmonary Adventitial Fibroblast Activation. *American Heart Association* 2015; **65**: 414–20.
65. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, et al. DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Research* 2009; **37**: 273-276.
66. Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism* 2010; **62**: 1733–43.
67. Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambion P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Genetics* 1995; **92**: 6991–5.
68. Montgomery RL, van Rooij E. Therapeutic Advances in MicroRNA Targeting. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2011; **57**: 1–7.
69. Moutier R., Tchang F., Caucheteux SM., Kanellopoulos-Langevin C. Placental Anomalies and Fetal Loss in Mice, After Administration of Doxycycline in Food for Tet-system Activation. *Transgenic Research* 2003; **12**: 369–73.

70. Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
71. Mylonas I. Antibiotic chemotherapy during pregnancy and lactation period: aspects for consideration. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2011; **283**: 7–18.
72. Nagy A. Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring. *Genetics* 1999; **26**: 99–109.
73. Nardiello C, Morty RE. MicroRNA in late lung development and bronchopulmonary dysplasia: the need to demonstrate causality. *Molecular and Cellular Pediatrics* 2016; **3**: 1–7.
74. Nielsen BS, Jørgensen S, Fog JU, et al. High levels of microRNA-21 in the stroma of colorectal cancers predict short disease-free survival in stage II colon cancer patients. *Clinical & Experimental Metastasis* 2011; **28**: 27–38.
75. Nolan K, Mitchem MR, Jimenez-Mateos EM, Henshall DC, Concannon CG, Prehn JHM. Increased expression of microRNA-29a in ALS mice: functional analysis of its inhibition. *Journal of Molecular Neuroscience* 2014; **53**: 231–41.
76. Olave N, Lal CV, Halloran B, et al. Regulation of alveolar septation by microRNA-489. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 2016; **310**: 476-487.
77. Ott CE, Grünhagen J, Jäger M, et al. MicroRNAs differentially expressed in postnatal aortic development downregulate elastin via 3' UTR and coding-sequence binding sites. *PLOS One* 2011; **6**: 1-12.
78. Papadopoulou AS, Dooley J, Linterman MA, et al. The thymic epithelial microRNA network elevates the threshold for infection-associated thymic involution via miR-29a mediated suppression of the IFN- $\alpha$  receptor. *Nature Immunology* 2011; **13**: 181–7.
79. Powers EA, Stamp-Cole M, Scott PS, et al. The tetracycline analogs minocycline and doxycycline inhibit angiogenesis in vitro by a non-metalloproteinase-dependent mechanism. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1995; **36**: 418–24.
80. Pullamsetti SS, Doebele C, Fischer A, et al. Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2012; **185**: 409–19.
81. Qin W, Chung ACK, Huang XR, et al. TGF- $\beta$ /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2011; **22**: 1462–74.
82. Rawlins EL, Perl A-K. The a"MAZE"ing world of lung-specific transgenic mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2012; **46**: 269–82.

83. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell* 2002; **110**: 513–20.
84. Robbins ME, Dakhllallah D, Marsh CB, Rogers LK, Tipple TE. Of mice and men: correlations between microRNA-17~92 cluster expression and promoter methylation in severe bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 2016; **311**: 981-984.
85. Roderburg C, Urban G-W, Bettermann K, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2011; **53**: 209–18.
86. Rogers LK, Robbins M, Dakhllallah D, et al. Attenuation of miR-17~92 Cluster in Bronchopulmonary Dysplasia. *Annals of The American Thoracic Society* 2015; **12**: 1506–13.
87. Rogler CE, Matarlo JS, Kosmyna B, Fulop D, Rogler LE. Knockdown of miR-23, miR-27, and miR-24 Alters Fetal Liver Development and Blocks Fibrosis in Mice. *Gene Expression* 2017; **17**: 99–114.
88. Roncarati R, Viviani Anselmi C, Losi MA, et al. Circulating miR-29a, Among Other Up-Regulated MicroRNAs, Is the Only Biomarker for Both Hypertrophy and Fibrosis in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 2014; **63**: 920–7.
89. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery* 2017; **16**: 203–22.
90. Saetrom P, Heale BSE, Snøve O, Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ. Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Research* 2007; **35**: 2333–42.
91. Santagati F, Minoux M, Ren S-Y, Rijli FM. Temporal requirement of Hoxa2 in cranial neural crest skeletal morphogenesis. *Development (Cambridge, England)* 2005; **132**: 4927–36.
92. Sanuki R, Onishi A, Koike C, et al. miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. *Nature Neuroscience* 2011; **14**: 1125–34.
93. Sauer B. Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/lox System. *Methods* 1998; **14**: 381–92.
94. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; **85**: 5166–70.

95. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in Development and Disease. *Physiological Reviews* 2011; **91**: 827–87.
96. Schmidt O. *Genetik und Molekularbiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017.
97. Shah MY, Ferrajoli A, Sood AK, Lopez-Berestein G, Calin GA. microRNA Therapeutics in Cancer - An Emerging Concept. *EBioMedicine* 2016; **12**: 34–42.
98. Sisson TH, Hansen JM, Shah M, et al. Expression of the reverse tetracycline-transactivator gene causes emphysema-like changes in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2006; **34**: 552–60.
99. Spandidos A, Wang X, Wang H, Seed B. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Research* 2010; **38**: D792-9.
100. Stenvang J, Petri A, Lindow M, Obad S, Kauppinen S. Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. *Silence* 2012; **3**: 1.
101. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 Site-specific Recombination: I. Recombination between loxP Sites. *Journal of Molecular Biology* 1981; **150**: 467–86.
102. Szczepanek J. Role of microRNA dysregulation in childhood acute leukemias: Diagnostics, monitoring and therapeutics: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Oncology* 2020; **11**: 348–69.
103. Tanimizu N, Kobayashi S, Ichinohe N, Mitaka T. Downregulation of miR122 by grainyhead-like 2 restricts the hepatocytic differentiation potential of adult liver progenitor cells. *Development (Cambridge, England)* 2014; **141**: 4448–56.
104. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; **105**: 13027–32.
105. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; **1803**: 1231–43.
106. Wang Y, Zhang X, Li H, Yu J, Ren X. The role of miRNA-29 family in cancer. *European Journal of Cell Biology* 2013; **92**: 123–8.
107. Weidle UH, Brinkmann U, Auslaender S. microRNAs and Corresponding Targets Involved in Metastasis of Colorectal Cancer in Preclinical In Vivo Models. *Cancer Genomics & Proteomics* 2020; **17**: 453–68.

108. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *W-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; **75**: 855–62.
109. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* 2009; **11**: 228–34.
110. Xu L-J, Ouyang Y-B, Xiong X, Stary CM, Giffard RG. Post-stroke treatment with miR-181 antagomir reduces injury and improves long-term behavioral recovery in mice after focal cerebral ischemia. *Experimental Neurology* 2015; **264**: 1–7.
111. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics* 2012; **13**: 134.
112. Zhang P, Huang A, Ferruzzi J, et al. Inhibition of microRNA-29 enhances elastin levels in cells haploinsufficient for elastin and in bioengineered vessels--brief report. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2012; **32**: 756–9.
113. Zhao Z, Wang L, Song W, et al. Reduced miR-29a-3p expression is linked to the cell proliferation and cell migration in gastric cancer. *World Journal of Surgical Oncology* 2015; **13**: 1–7.
114. Zhou S, Wang Y, Meng Y, et al. In Vivo Therapeutic Success of MicroRNA-155 Antagomir in a Mouse Model of Lupus Alveolar Hemorrhage. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2016; **68**: 953–64.

**7 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort/Datum

---

Unterschrift

## 8 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

### Publikation:

**Hönig J**, Mižíková I, Nardiello C, Surate Solaligue DE, Daume MJ, Vadász I, Mayer K, Herold S, Günther S, Seeger W, Morty RE. Transmission of microRNA antimirs to mouse offspring via the maternal-placental-fetal unit. RNA. 2018 Jun;24(6):865-879.

### Kongressbeiträge:

- Februar 2016: Posterpräsentation, Jahrestreffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung, Hannover
- September 2016: Posterpräsentation, European Respiratory Society Annual Congress, London

## 9 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen, die mir die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht und mich dabei unterstützt und begleitet haben.

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Werner Seeger bedanken, der es mir ermöglicht hat diese Arbeit in seiner Abteilung am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim zu erstellen.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Rory E. Morty, unter dessen Supervision diese Arbeit entstanden ist. Danke für den tiefen Einblick in die Laborarbeit und die vielen lehrreichen Erfahrungen, die ich in dieser Zeit sammeln durfte. Vor allem aber danke für die sehr offene und fördernde Atmosphäre in der AG Morty, die Du dort maßgeblich vorgegeben und mitgelebt hast.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Ivana Mižíková für die Einführung in die Laborarbeit und die Begleitung dieser gesamten Arbeit bedanken. Trotz ihrer nicht enden wollenden Liste eigener Aufgaben, fand sie stets Zeit mir Dinge zu erklären oder mit mir die nächsten Schritte der Versuche zu planen und mich bei der Durchführung zu unterstützen.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Dr. Claudio Nardiello, der ebenfalls stets ein offenes Ohr für mich hatte und dieses Projekt mit seinen Ratschlägen unterstützt hat.

Insgesamt möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Morty bedanken, ohne die die Erstellung dieser Arbeit und die Zeit im Labor wesentlich weniger Spaß gemacht hätte und mir sicher nicht so positiv in Erinnerung geblieben wäre.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Dr. Stefan Günther vom Max-Planck-Institut in Bad Nauheim für die Unterstützung bei der Vorbereitung und die Durchführung der RNA-Sequenzierung.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie, die mir stets motivierend zur Seite stand und mich vor allem mental bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt hat.