

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

MicroRNA-Regulation in experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis im Vergleich mit Multiple Sklerose- Läsionen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Juliane Lescher

aus

Göttingen

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Brück

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. A. Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Multiple Sklerose	1
1.2	Tiermodelle der Multiplen Sklerose	4
1.3	MicroRNAs.....	6
1.4	Zielsetzung.....	8
2	Zusammenfassende Darstellung der Methoden	9
2.1	Gewebeproben der Weißbüschelaffen	9
2.2	Gewebeproben der Mäuse	9
2.3	Makrosezierung der Weißbüschelaffengewebeproben	10
2.4	Histopathologie.....	11
2.5	RNA-Extraktion.....	11
2.6	qPCR-TaqMan LDAs	12
2.7	qPCR-Einzelreaktionen	12
2.8	Menschliche Gewebeproben.....	13
2.9	Statistische Auswertung.....	13
3	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse	14
3.1	Histopathologische Auswertung der Entzündungsläsionen.....	14
3.2	MiRNA-Regulation in EAE in Mäusen und Weißbüschelaffen ähnelt jener in humanen MS-Läsionen	15
3.2.1	MiRNA-Regulation in EAE-Rückenmarksläsionen von Mäusen	15
3.2.2	MiRNA-Regulation in EAE-Läsionen von Weißbüschelaffen.....	17
4	Diskussion.....	19
5	Literaturverzeichnis	22
6	Kopie der Publikation	28

Abkürzungsverzeichnis

AntimiRs	~ chemisch modifizierte, zur reifen miRNA komplementäre Oligonukleotide
C57BL/6	~ für Laborversuche häufig verwendeter Inzucht-Mausstamm
CD3	cluster of differentiation 3
cDNA	complementary DNA
CT-Wert	cycle threshold = Zyklusschwellenwert
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded Disability Status Scale ~ erweiterte Skala zur Bestimmung des Behinderungsgrades bei der MS
ERG	Ersatzreferenzen
FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded = in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet
HCV	Hepatitis-C-Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
KFA	komplettes Freund's Adjuvans
LDA	Low-Density Array
LFB-PAS	Luxol fast blue-Perjodsäure-Schiff'sches Reagenz
Mac3	Macrophage-3 antigen
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	myelin basic protein = basisches Myelinprotein
miRNA	microRNA
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNA	messenger RNA
MRP14	myeloid related protein 14
MS	Multiple Sklerose
NAWM	normal appearing white matter = normal erscheinende weiße Substanz
PLP	Proteolipid-Protein
PP MS	primary progressive MS = primär chronisch-progrediente MS
pre-miRNA	precursor-miRNA = Vorläufer-miRNA
pri-miRNA	primäre-miRNA
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RR MS	relapsing remitting MS = schubförmig remittierende MS
snRNA	small nuclear RNA
SP MS	secondary progressive MS = sekundär progrediente MS
T _H 1-Zellen	Typ1-T-Helferzellen
T _H 17-Zellen	Typ17-T-Helferzellen
T _{reg} -Zellen	regulatorischen T-Zellen
UNG	Uracil N-Glykosylase
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS), auch bekannt als Enzephalomyelitis disseminata, ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) und die häufigste Ursache erworbener Behinderung im jungen Erwachsenenalter (Compston und Coles 2002).

Der klinische Verlauf der MS kann individuell sehr unterschiedlich sein, es werden aber hauptsächlich drei Verlaufsformen unterschieden. Die häufigste Form ist die schubförmig remittierende MS (*relapsing remitting MS*, RR MS), die bei 85-90% der Patienten auftritt. Sie ist charakterisiert durch Schübe, in denen neurologische Funktionsstörungen auftreten, und Phasen der Remission, in denen sich die Symptome verbessern oder ganz abklingen. In den meisten Fällen geht die RR MS im Krankheitsverlauf in eine sekundär progrediente MS (*secondary progressive MS*, SP MS) über, die klinisch durch einen langsamen, aber voranschreitenden neurologischen Funktionsabbau gekennzeichnet ist. In 10-15% der Gesamtfälle der MS verläuft die Krankheit primär chronisch-progredient (*primary progressive MS*, PP MS). Bei dieser MS-Variante schreitet der neurologische Funktionsabbau schneller voran und es zeigen sich keine Phasen der Remission (Lublin und Reingold 1996).

Weitere Erkrankungen aus dem Formenkreis der MS sind die akute maligne MS (Marburg-Krankheit), die Neuromyelitis optica (Dévic-Syndrom), die diffuse Sklerose (Schilder-Krankheit), die konzentrische Sklerose (Baló-Krankheit) und die akute demyelinisierende Enzephalomyelitis (ADEM) (Storch et al. 1998).

In Deutschland liegt die Prävalenz der MS bei ca. 150 auf 100.000 Einwohner. Hochgerechnet leiden damit in Deutschland 122.000 Menschen an MS (Hein und Hopfenmüller 2000). Weltweit sind etwa 2,5 Mio. Menschen an MS erkrankt (Compston und Coles 2002). Als Hochrisikogebiete gelten Zentral-, Ost- und Nordeuropa, die nördlichen Teile der USA, die südlichen Teile von Kanada, Neuseeland und Südastralien (Kurtzke 1993). Die Manifestation der Erkrankung erfolgt in der Regel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Frauen erkranken etwa doppelt so häufig wie Männer (Weinshenker et al. 1989).

Die Symptome der MS und auch ihr Schweregrad können abhängig von den betroffenen ZNS-Strukturen sehr unterschiedlich sein, und es gibt keine sicheren diagnostischen Parameter, die eine individuelle Krankheitsprognose ermöglichen (Vukusic und Confavreux 2007). Durch Defizite der sensorischen, motorischen, autonomen und neurokognitiven Funktionen führt die MS häufig zu einer chronischen Behinderung. Initial manifestiert sich die MS oft durch eine Optikusneuritis oder Paresen in Kombination mit Sensibilitätsstörungen. Weitere Symptome können im Verlauf Ataxie, kognitive Einschränkungen, psychiatrische Auffälligkeiten, Fatigue, Schmerzen, Blasen-

und Mastdarmstörungen sowie Einschränkungen der Sexualfunktion sein (Charcot 1868; Noseworthy et al. 2000).

15 Jahre nach Krankheitsbeginn sind 21% der MS-Patienten nicht mehr in der Lage, ohne Unterstützung (Krücke, Stock, Schiene) zu gehen und sind somit in ihren alltäglichen Aktivitäten eingeschränkt. Dies entspricht einem EDSS von 6 (EDSS, *Expanded Disability Status Scale* ~ erweiterte Skala zur Bestimmung des Behinderungsgrades bei der MS). Ein Wert von 6 wird als schwere Behinderung eingestuft. Dieser Grad der Behinderung wird durchschnittlich 28 Jahre nach Ausbruch der Erkrankung erreicht (Kurtzke 1983; Tremlett et al. 2006).

Die MS ist bis heute nicht kurativ therapierbar. Die derzeitigen therapeutischen Maßnahmen sind daher darauf ausgerichtet, der entzündlichen Krankheitsaktivität entgegenzuwirken und durch die Minderung der Schubaktivität das Fortschreiten der körperlichen Behinderung einzudämmen. Zusätzlich zur Schubtherapie und der immunmodulierenden Langzeittherapie ist die Behandlung symptomatischer Beschwerden von großer Bedeutung für die Lebensqualität der Patienten. Aus diesem Grunde findet in der Regel eine interdisziplinäre Zusammenarbeit verschiedener Fachrichtungen statt (Rieckmann 2006).

Aufgrund der Heterogenität des klinischen Bildes der MS ist die Therapie für jeden Patienten individuell zu definieren und regelmäßig zu evaluieren. Als Standardtherapie des akuten MS-Schubs mit funktioneller Beeinträchtigung gilt eine Pulstherapie mit hochdosiertem Glukokortikoid (Methylprednisolon). Führt die Kortikoidpulstherapie nicht zu einer Verbesserung der Symptome oder handelt es sich um einen sehr schweren Schub kann eine Plasmapherese Mittel der Wahl sein. Ziel der Schubtherapie ist in jedem Falle eine möglichst schnelle und komplette Remission der Schubsymptome (Rieckmann 2006).

Da bereits beim ersten Schub axonale Schädigungen und Atrophien auftreten können, ist ein möglichst früher Beginn einer entzündungshemmenden immunmodulierenden Basistherapie erstrebenswert. Diese Langzeittherapie wird in der Regel mit rekombinanten Interferon- β -Präparaten oder Glatirameracetat durchgeführt. Wenn Kontraindikationen gegen diese Mittel bestehen, kann die Basistherapie alternativ mit Azathioprin oder intravenösen Immunglobulinen stattfinden. Ziel der Basistherapie ist eine reduzierte Schubzahl und Schubschwere bzw. eine Verhinderung der Schübe und damit des Voranschreitens der neurologischen Defizite (Rieckmann 2006).

Bei Patienten mit anhaltender Krankheitsaktivität oder rasch fortschreitender RR MS trotz Basistherapie wird eine sogenannte Eskalationstherapie empfohlen. Dabei kommen Natalizumab (monoklonale Antikörper), Fingolimod, Mitoxantron oder in seltenen Fällen Cyclophosphamid zum Einsatz. Die immuntherapeutische Behandlung wird im Allgemeinen fortgeführt, solange eine positive Wirkung auf die Entwicklung der MS festzustellen ist und keine schwerwiegenden

Nebenwirkungen auftreten. Die Therapie der SP MS wird in erster Linie mit Mitoxantron durchgeführt. Die PP MS ist nur sehr schwer therapierbar (Diener und Weimar 2012).

Histopathologisches Kennzeichen der MS sind fokale Läsionen, die durch Demyelinisierung, Entzündungsinfiltrat, gliale Narbenbildung, Astrozytose, Oligodendrozytenschädigung und unterschiedlich stark ausgeprägte Axondegeneration gekennzeichnet sind. Die Läsionen können im gesamten ZNS auftreten und sind sowohl in der weißen Substanz als auch im Kortex und anderen Bereichen der grauen Substanz nachweisbar. Prädilektionsstellen sind dabei die Sehnerven, das Kleinhirn, der Hirnstamm, das periventrikuläre Marklager und die weiße Substanz des Rückenmarks. Die multifokal auftretenden Läsionen können unterschiedlich groß sein und formieren sich in der Regel um eine oder mehrere kleine bis mittelgroße Venen. Das zugehörige Entzündungsinfiltrat besteht zum Großteil aus Makrophagen und einigen Lymphozyten (Geurts und Barkhof 2008; Noseworthy et al. 2000).

Die Läsionsaktivität wird nach dem Vorhandensein von Myelinabbauprodukten in den Makrophagen und der Expression von Makrophagenaktivierungsmarkern bestimmt. Es werden früh aktive (*early active*), spät aktive (*late active*), inaktiv demyelinisierte (*inactive demyelinated*), früh remyelinisierende (*early remyelinating*) und spät remyelinisierende Läsionen (*late remyelinating* bzw. *shadow plaques*) unterschieden (Lucchinetti et al. 1999).

In früh aktiven demyelinisierenden Läsionen konnten vier fundamental unterschiedliche Demyelinisierungsmuster definiert werden. Das histologische Muster I ist durch eine T-Zell- und Makrophagen-vermittelte Myelinschädigung charakterisiert. Das Hauptcharakteristikum des Musters II ist die massive Ablagerung von Immunglobulin- und Komplementkomponenten in den Regionen der aktiven Myelinschädigung. Muster III-Läsionen zeigen eine primäre Oligodendrozytendystrophie mit einem überproportionalen Verlust des Myelin-assoziierten Glykoproteins (MAG) sowie Oligodendrozytenapoptosen. Die seltenen Muster IV-Läsionen zeigen eine Oligodendrozytendegeneration in einem schmalen Rand periläsional in der weißen Substanz. Innerhalb eines Patienten zeigen die aktiven Läsionen ein relativ konstantes Entmarkungsmuster (Lucchinetti et al. 2000). Je nach Krankheitsdauer und -verlauf kann hingegen das histopathologische Bild der chronischen Läsionen (Ausmaß von Entzündungsinfiltrat, Oligodendrozytendegeneration, Demyelinisierung, Remyelinisierung und Axonverlust) sehr unterschiedlich sein (Kuhlmann et al. 2002).

Bei der Pathogenese der MS geht man von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Nach dem derzeitigen Wissenstand ist die MS eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung gegen bestimmte Bestandteile des ZNS, bei der zusätzlich genetische (Ebers et al. 2000; Dymment et al. 2004), epidemiologische (Kurtzke 1993) und Umweltfaktoren (Gale und Martyn 1995) eine Rolle spielen.

Vermutlich beginnt die Pathogenese mit der Aktivierung von autoreaktiven CD4⁺ T-Helferzellen durch antigenpräsentierende Zellen im peripheren Blut und in Lymphknoten. Der Auslöser dieser antigenspezifischen Aktivierung von T-Zellen ist noch nicht hinreichend bekannt, denn auch in gesunden Menschen sind viele autoreaktive T-Zellen nachweisbar (Saruhan-Direskeneli et al. 1993; Zhang et al. 1994). Vor allem Interferon- γ produzierende Typ1- (T_H1-Zellen) und Interleukin-17 produzierende Typ17-T-Helferzellen (T_H17-Zellen) spielen in der Pathogenese der MS eine wichtige Rolle. Die T-Zellen lagern sich mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen an das Endothel der Blut-Hirn-Schranke an, spalten durch spezifische Enzyme die Tight Junctions und migrieren in das ZNS. Dort wird durch das Erkennen von spezifischen Antigenen auf antigenpräsentierenden Zellen eine verstärkte Immunantwort hervorgerufen. Man geht davon aus, dass die T-Zellen auch auf bestimmte Myelinproteine wie das basische Myelinprotein (*myelin basic protein*, MBP), Proteolipid-Protein (PLP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) und Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) reagieren. Durch proinflammatorische Zytokine wird die residente Mikroglia aktiviert, und Effektorzellen wie Makrophagen, zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen werden angezogen und stimuliert. Makrophagen und Mikroglia sezernieren schädigende Zytokine und aktivieren das Komplementsystem. CD8⁺ T-Zellen treten in größeren Mengen perivaskulär im Entzündungsinfiltrat auf, geben zytotoxische Granula ab und induzieren apoptotische Vorgänge. T-Zellen aktivieren B-Zellen und führen so zur Sezernierung von spezifischen Autoantikörpern. Letztendlich führt ein komplexes Zusammenspiel dieser Komponenten zu einer direkten und zu einer antikörpervermittelten Demyelinisierung, zu Oligodendrozytenschädigung, reaktiver Astroglie und Axondegeneration (Wu und Alvarez 2011).

1.2 Tiermodelle der Multiplen Sklerose

Viele Erkenntnisse über die Pathogenese und Therapie der MS wurden in Tiermodellen gewonnen. Aufgrund der klinischen und pathologischen Heterogenität der MS gibt es kein Tiermodell, welches alle Facetten des Krankheitsbildes erfasst. Stattdessen gibt es verschiedene Tiermodelle, die jeweils einzelne immunpathogenetische Aspekte darstellen und so zur Untersuchung spezieller pathologischer Prozesse und Reparationsmechanismen sowie zur Erprobung neuer Therapieansätze eingesetzt werden können. Eines der am häufigsten verwendeten Tiermodelle zur Darstellung der inflammatorischen Komponente der MS ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Durch eine induzierte Autoimmunreaktion können mit diesem Modell entzündliche Vorgänge, die zur Demyelinisierung führen, recht gut nachgebildet werden (Kipp et al. 2009).

Es gibt verschiedene Formen der EAE, die sich durch die Tierart, die Art und Weise der Immunisierung und die unterschiedlichen Autoantigene unterscheiden. Die Ausprägung und der

klinische Verlauf der EAE, monophasisch oder mehrphasisch, können daher stark variieren. Als Tiere kommen in erster Linie Mäuse, Ratten und Primaten in Frage. Immunisiert wird entweder aktiv durch die Gabe eines entsprechenden Autoantigens, welches isoliertes Myelin oder ein Myelinpeptid sein kann, oder passiv durch die Übertragung von isolierten myelinspezifischen T-Zellen eines zuvor aktiv immunisierten Spenders auf einen gesunden Empfänger. Außerdem gibt es mittlerweile transgene Mausstämme, die spontan eine EAE entwickeln. Als klassische Autoantigene dienen Myelinpeptide des ZNS wie MBP, PLP und MOG. Neben weiteren Myelinantigenen sind mittlerweile auch gliale und neuronale Antigene zur Induktion einer EAE bekannt (Krishnamoorthy und Wekerle 2009).

Das MOG befindet sich auf der äußersten Lamelle der Myelinscheide und auf der Oberfläche von reifen Oligodendrozyten, dabei macht es weniger als 0,05% der Myelinproteine aus. Untersuchungen an MS-Patienten konnten eine T-Zell-Antwort auf das MOG nachweisen, es wird daher davon ausgegangen, dass das MOG eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der MS spielt (Kerlero de Rosbo et al. 1993). Unterschiedliche MOG-Peptide induzieren in C57BL/6-Mäusen eine Immunantwort, die sich durch eine signifikante T-Zell-Reaktion darstellt. Die durch das MOG₃₃₋₅₅-Peptid verursachte EAE hat sich zu einem sicheren und weit verbreiteten MS-Modell zur Darstellung der Entzündungsreaktion im ZNS etabliert. Der klinische Verlauf dieser EAE ist chronisch, nicht-remittierend und lässt sich gut reproduzieren. Histologisch sind große, perivaskuläre, akut entzündliche Läsionen mit Demyelinisierung im Rückenmark zu beobachten (Mendel et al. 1995).

Primaten haben aufgrund ihrer genetischen und immunologischen Nähe zum Menschen eine besondere Bedeutung in der Forschung. In der präklinischen Bewertung vieler Medikamente sind sie unabdingbar. Die am häufigsten untersuchten Primatenmodelle der MS sind die EAE in Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) und in Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*). Die Immunisierung mit rekombinantem Protein (rMOG) korrespondierend zu der N-terminalen Sequenz von Ratten-MOG (Aminosäure 1-125) führt bei Weißbüschelaffen zur Ausbildung einer EAE. Der klinische Verlauf dieser EAE ist primär chronisch-progredient. Die demyelinisierten Läsionen befinden sich vor allem in der weißen Substanz des Gehirns, sie können aber auch im Rückenmark und im Sehnerv auftreten. Die Läsionen sind groß, konfluierend und können fast die gesamte Hemisphäre ausfüllen. Das Entzündungsinfiltrat besteht vor allem aus Makrophagen, Mikroglia und T-Zellen. Perivaskulär sind daneben aber auch einige B-Zellen zu finden. Wie bei der MS, aber im Gegensatz zu den Nagetiermodellen, gibt es individuelle Variationen ('t Hart et al. 2000; Merkler et al. 2006a).

1.3 MicroRNAs

Reife microRNAs (miRNAs) sind kurze, hoch konservierte, nicht kodierende, einzelsträngige RNAs mit einer Länge von durchschnittlich 22 Nukleotiden. MiRNAs haben wichtige Funktionen bei der Genregulation. Sie können die Translation hemmen oder eine Degradation der Ziel-mRNA (*messenger RNA*) herbeiführen. Dies geschieht durch die Bindung der miRNA an eine spezifische Sequenz in der 3'-untranslatierten Region der mRNA von Zielgenen (Bartel 2004). Eine miRNA kann Hunderte von Ziel-mRNAs haben (Baek et al. 2008; Selbach et al. 2008). Man geht davon aus, dass die Expression von mehr als einem Drittel aller Gene im menschlichen Genom durch miRNAs feinreguliert wird (Lewis et al. 2005).

MiRNAs können sowohl in Introns und Exons nicht-kodierender Regionen als auch in Introns kodierender Gene lokalisiert sein (Rodriguez et al. 2004). Nach der Transkription durch die RNA-Polymerasen II und III entsteht eine lange primäre-miRNA (pri-miRNA). Posttranskriptional erfolgt zunächst eine Prozessierung durch die Endoribonuklease Drosha. Aus der pri-miRNA geht so die ca. 60-70 Nukleotide lange Vorläufer-miRNA (*precursor-miRNA*, pre-miRNA) hervor. Die haarnadelstrukturförmige pre-miRNA wird aktiv aus dem Zellkern ins Zytosol transportiert. Im Zytosol entsteht durch die Endoribonuklease Dicer die reife, einzelsträngige miRNA. Diese nimmt dann im Zusammenspiel mit einem Komplex aus unterschiedlichen Proteinen, dem *RNA-induced silencing complex*, Einfluss auf die Translation (Bartel 2004).

Die Deletion von miRNA-Prozessierungsfaktoren wie der Endoribonuklease Dicer wird im Tiermodell genutzt um herauszufinden, in welchem Ausmaß miRNAs in einem speziellen regulatorischen Prozess beteiligt sind (Bartel 2004).

MiRNAs wurden 1993 das erste Mal beschrieben, die Klassifizierung erfolgte jedoch erst später (Lee et al. 1993). Zur Nomenklatur: reife miRNAs werden mit „miR“ und einer Nummer, welcher ein bestimmter Genlokus zugeordnet ist, beschrieben, z.B. „miR-155“. Zusätzliche Buchstaben-Suffixe stehen für geringfügige Unterschiede in den Sequenzen der miRNAs. Reife miRNAs, die aus verschiedenen Enden der gleichen pre-miRNA hervorgehen, werden mit dem Suffix -3p (3'-Ende) bzw. -5p (5'-Ende) gekennzeichnet (Griffiths-Jones et al. 2006). In menschlichen Zellen konnten bislang über 1500 verschiedene miRNAs nachgewiesen werden (Kozomara und Griffiths-Jones 2011). Viele dieser miRNAs sind auch in anderen Spezies, vor allem in anderen Säugetieren, hochgradig konserviert (Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001; Lee und Ambros 2001).

MiRNAs sind in viele physiologische Prozesse wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose, Stressantwort und Entzündungsreaktion involviert. Sie sind wichtig für die korrekte Funktion des ZNS (Coolen und Bally-Cuif 2009; Kosik 2006) und die Entwicklung und Regulation des Immunsystems (Lodish et al. 2008; O'Connell et al. 2010a; Taganov et al. 2007). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass miRNAs auch für die Immuntoleranz (adaptives Immun-

system) wichtig sind. Fehlt beispielsweise die Dicer-abhängige miRNA-Prozessierung in regulatorischen T-Zellen (T_{reg} -Zellen), entwickeln die Mäuse eine Autoimmunerkrankung, die mit dem Autoimmunsyndrom von Mäusen mit komplettem Verlust von T_{reg} -Zellen vergleichbar ist (Liston et al. 2008; Zhou et al. 2008).

Auch die Entwicklung und Homöostase von Zellen und Geweben wird durch miRNA beeinflusst. Die Art und Anzahl der miRNA-Expression zeigt oft eine enge Korrelation zum Entwicklungsstand der Zelle. Viele miRNAs werden in spezifischen Zelltypen und während bestimmter Entwicklungsstadien besonders stark exprimiert (Lagos-Quintana et al. 2002; Lau et al. 2008). In Astrozyten und Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die Expressionslevel bestimmter miRNAs von proinflammatorischen Zytokinen reguliert werden (Junker et al. 2009).

Für verschiedene neurologische Krankheiten wie Hirntumore (Nicoloso und Calin 2008), Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson (Eacker et al. 2009; Hebert und De Strooper 2009) konnte nachgewiesen werden, dass miRNAs in die Pathogenese involviert sind. Auch bei der MS geht man davon aus, dass miRNAs an der Pathogenese beteiligt sind. Im Tiermodell konnte beispielsweise gezeigt werden, dass miR-124 durch die Deaktivierung von Makrophagen und Mikroglia die EAE-Symptome und die Entzündungsreaktion im ZNS verringert (Ponomarev et al. 2011) und dass die miRNA let-7e die Entwicklung von T_{H1} - und T_{H17} -Zellen stimuliert und auf diese Weise die EAE-Symptome verstärkt (Guan et al. 2013).

Mittlerweile gibt es mehrere Studien, die miRNA-Expressionsprofile in MS-Patienten darstellen. In den meisten dieser Untersuchungen wurde die miRNA-Expression im Blut von MS-Patienten analysiert (Cox et al. 2010; De Santis et al. 2010; Du et al. 2009; Fenoglio et al. 2011; Guerau-de-Arellano et al. 2011; Keller et al. 2009; Lindberg et al. 2010; Martinelli-Boneschi et al. 2012; Otaegui et al. 2009; Paraboschi et al. 2011; Siegel et al. 2012; Waschbisch et al. 2011). Die Ergebnisse der Studien sind teilweise unterschiedlich. Diese Differenzen sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass es Unterschiede im untersuchten Material (z.B. Vollblut, Plasma, isolierte Monozyten oder Lymphozyten), den Patientengruppen (u.a. Alter, Krankheitsdauer, Krankheitsverlauf, Krankheitsphase), der Therapie der Patienten und der Methode der Quantifizierung und Normalisierung gab. Eine Studie konnte zeigen, dass auch im Liquor cerebrospinalis eine spezifische miRNA-Regulation in MS-Patienten gegenüber Kontrollpatienten nachweisbar ist (Haghikia et al. 2012).

Außerdem gibt es zwei Studien, die spezifische miRNA-Expressionsprofile in aktiven und inaktiven Hirnläsionen von MS-Patienten beschreiben. Sie konnten zeigen, dass miR-155 sowohl in aktiven Läsionen als auch in der normal erscheinenden weißen Substanz (*normal appearing white matter*, NAWM) von MS-Patienten sehr hoch exprimiert wird (Junker et al. 2009; Noorbakhsh et al. 2011). Es ist bekannt, dass miR-155 die Immunantwort beeinflusst, indem sie die T-Zell-abhängige Gewebeentzündung moduliert. Dies geschieht unter anderem durch

Änderungen in Aktivierungs- und Differenzierungsmustern von T_H1- und T_H17-Zellen. In Mäusen führte das Fehlen von miR-155 zu einer weniger ausgeprägten EAE mit milder klinischer Manifestation und nur geringem Entzündungsinfiltrat in der histologischen Untersuchung. Außerdem war im ZNS und in den peripheren lymphatischen Organen eine Abschwächung der T_H1- und T_H17-Zellantwort nachweisbar. Die miR-155 kann daher möglicherweise als ein Angriffspunkt in der Therapie der MS und anderer Autoimmunerkrankungen dienen (Murugaiyan et al. 2011; O'Connell et al. 2010b).

1.4 Zielsetzung

In Tiermodellen verschiedener Krankheiten konnte gezeigt werden, dass miRNAs einen potentiellen neuen Therapieansatz darstellen (Czech 2006; Elmen et al. 2008; Krutzfeldt et al. 2005). MiRNAs könnten auch zu *neuen Therapieformen in Autoimmunerkrankungen* wie der MS führen. Des Weiteren ist die Detektion bestimmter miRNAs als ein *diagnostischer oder prognostischer klinischer Biomarker für die MS* wünschenswert. Anhand von spezifischen miRNA-Expressionsprofilen könnten die Krankheitsaktivität und der -verlauf (Subtyp) bestimmt werden. Für verschiedene Krankheiten wie Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen und Hirnschädigungen konnten im Blutplasma bereits spezifische zirkulierende miRNAs als Biomarker bestimmt werden (Boeri et al. 2011; Mitchell et al. 2008; Redell et al. 2010).

Sowohl die Tiermodelle als auch Studien an MS-Patienten geben immer mehr Aufschluss über die Funktion von miRNAs in der Pathogenese der MS. Die meisten Untersuchungen werden zunächst im Tiermodell durchgeführt. Um einen Bezug zum Krankheitsbild der MS herzustellen, ist es wichtig, die *Vergleichbarkeit der Tiermodelle mit der MS* zu prüfen. In der vorliegenden Arbeit sollen daher miRNA-Expressionsprofile in MOG-induzierten EAE-Läsionen von Mäusen und Weißbüschelaffen dargestellt werden. Diese sollen dann mit zuvor erhobenen Daten in MS-Läsionen verglichen werden (Junker et al. 2009).

Im ersten Schritt sollen die EAE-Läsionen histopathologisch untersucht und mit MS-Proben verglichen werden. Im zweiten Schritt erfolgt dann eine RNA-Extraktion aus den EAE-Läsionen der Mäuse und Weißbüschelaffen. Nach der Umschreibung in cDNA (*complementary DNA*) können die miRNAs, die in der MS auffällig waren, mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) detektiert und quantifiziert werden. Aus der relativen Expression der miRNAs in den EAE-Läsionen im Vergleich zum nicht entzündlich veränderten Kontrollgewebe ergibt sich dann die miRNA-Regulation. Die miRNA-Regulation in MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE-Läsionen in C57BL/6-Mäusen und MOG₁₋₁₂₅-induzierten EAE-Läsionen in Weißbüschelaffen kann dann mit der bekannten miRNA-Regulation in aktiven humanen MS-Läsionen verglichen werden.

2 Zusammenfassende Darstellung der Methoden

2.1 Gewebeproben der Weißbüschelaffen

Vom Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen wurden 16 Hirngewebe-proben von Weißbüschelaffen bereitgestellt, die in früheren Projekten gewonnen worden waren (Diem et al. 2008; Merkler et al. 2006a; Merkler et al. 2006b). Die Proben waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (*formalin-fixed, paraffin-embedded*, FFPE). Es wurden zehn Proben mit EAE-Läsionen und sechs Proben mit NAWM von Kontrolltieren untersucht. Zur aktiven Induktion der EAE waren die Weißbüschelaffen mit rekombinantem Protein (rMOG) korrespondierend zu der N-terminalen Sequenz von Ratten-MOG (Aminosäure 1-125), welches in komplettem Freund's Adjuvans (KFA) gelöst war, immunisiert worden. Der Gesundheitszustand der Tiere war täglich anhand eines EAE-Scores bewertet worden. Weißbüschelaffen, die schwere und irreversible EAE-Symptome zeigten, wurden aus ethischen Gründen getötet. Die durchschnittliche Überlebensrate betrug 6 Wochen. Für die histopathologische Untersuchung waren die Tierkörper zunächst über Nacht in Formalin fixiert worden. Rückenmark und Hirn waren dann herausgelöst und in Paraffin eingebettet worden.

Alle Versuche wurden nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes des Landes Niedersachsen durchgeführt und waren in Tierversuchsanträgen von der entsprechenden Behörde genehmigt worden.

2.2 Gewebeproben der Mäuse

Zudem wurden 27 Rückenmarksproben von C57BL/6-Mäusen untersucht, 17 EAE-Proben und zehn Kontrollgewebe. Zur aktiven Induktion der EAE wurden zunächst 20 weibliche 6-8 Wochen alte C57BL/6-Mäuse mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid immunisiert. Dazu wurde den Tieren subkutan in alle vier Extremitäten jeweils 50 µg MOG₃₅₋₅₅-Peptid injiziert. Die Gesamtmenge von 200 µg MOG₃₅₋₅₅-Peptid wurde zuvor in 200 µg KFA emulgiert. KFA wurde aus inkomplettem Freund's Adjuvans (Mischung aus Mannose Monooleat und Paraffinöl) und 5mg/ml Mycobacterium tuberculosis hergestellt.

Zur Erhöhung der vaskulären Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und zur Induktion von autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie erhielten die Mäuse zusätzlich am Tag der Immunisierung und 48 Stunden später intraperitoneal jeweils 300 ng Pertussistoxin, welches in 300 µl steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung gelöst war.

Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten. Ab dem siebten Tag nach der Immunisierung wurden die Mäuse, einschließlich der zehn nicht-immunisierten Kontrollmäuse, täglich gewogen und ihr Gesundheitszustand wurde anhand eines EAE-Scores

bewertet: 0 = normal, 1 = reduzierter Schwanztonus, 2 = Schwanzlähmung und verminderte reflektorische Ausgleichsbewegungen, 3 = Fehlen reflektorischer Ausgleichsbewegungen beim Gehen, 4 = Gangataxie, 5 = leichte Lähmung der Hinterbeine, 6 = mittelgradige Lähmung beider Hinterbeine, 7 = schwere Lähmung der Hinterbeine oder Paraplegie, 8 = Tetraparese, 9 = moribund, 10 = tot. Mäuse, die entweder eine mittelgradige Lähmung der Hinterbeine (Score 6) entwickelten oder für mehr als vier Tage eindeutige klinische EAE-Symptome zeigten, wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet.

Eine Maus starb direkt nach der Immunisierung und zwei weitere Mäuse zeigten nach 30 Tagen keine deutlichen EAE-Zeichen (nicht erkrankt). Diese drei Mäuse wurden daher von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die mittlere Überlebensdauer der EAE-Mäuse betrug 16,6 +/- 4,3 Tage. Die Kontrollmäuse wurden nach 16 Tagen getötet.

Zur Tötung wurden die Mäuse zunächst mit einer Überdosis Ketamin-Xylazin narkotisiert. In tiefer Narkose wurde dann der Thorax eröffnet. Zur Auswaschung des Blutes aus dem Gewebe wurden die Tiere durch die linke Herzkammer mit 0,9%iger NaCl-Lösung perfundiert. Im Anschluss wurde mit Hilfe eines Skalpells das Rückenmark herausgetrennt, in vier bis fünf etwa gleichgroße Stücke zerteilt und für die weitere histopathologische Untersuchung und RNA-Extraktion schockgefroren. Zur histologischen Untersuchung wurden auf dem Kryostat 7 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Glasobjektträger gezogen.

Alle Versuche wurden nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes des Landes Niedersachsen durchgeführt und waren in Tierversuchsanträgen von der entsprechenden Behörde genehmigt worden.

2.3 Makrosezierung der Weißbüschelaffengewebeproben

Die FFPE-Proben der Weißbüschelaffen wurden mit dem Mikrotom geschnitten und auf folienbeschichtete (Polyethylen-Naphthalat) Objektträger aufgezogen. Zur Identifikation der Läsionen wurden zunächst 3µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Luxol fast blue-Perjodsäure-Schiffssches Reagenz (LFB-PAS) gefärbt. Für die spätere RNA-Gewinnung wurden alle weiteren Schnitte in einer Dicke von 9 µm angefertigt. Mit einem Skalpell wurden die vorher definierten inflammatorischen Bereiche in der weißen Hirnsubstanz vom Objektträger herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Für die nachfolgende RNA-Extraktion wurden von jeder Probe zehn dieser 9 µm dicken Schnitte in einem Reaktionsgefäß zusammengefasst. Mit der weißen Substanz der Kontrollen wurde in gleicher Art und Weise verfahren.

2.4 Histopathologie

Zunächst wurden Standardfärbungen mit HE und LFB-PAS durchgeführt, um das Ausmaß der Entzündung und der Demyelinisierung beurteilen zu können. Des Weiteren wurden zur genaueren Beurteilung der T-Zell- und Makrophageninfiltration immunhistochemische Färbungen mit 3,3'-Diaminobenzidin als Chromogen und Antikörpern gegen CD3 (*cluster of differentiation 3*) sowie MRP14 (*myeloid related protein 14*) bei den Proben der Weißbüschelaffen und Mac3 (*Macrophage-3 antigen*) bei den Proben der Mäuse durchgeführt. Die histopathologische Auswertung erfolgte mittels Lichtmikroskopie.

2.5 RNA-Extraktion

Vor der RNA-Extraktion musste das FFPE-Gewebe zuerst deparaffiniert und lysiert werden. Dazu wurde zu jedem Reaktionsgefäß (jeder Probe) Lysepuffer (50 mM Tris, 25 mM EDTA, 500 mM NaCl, 0.1% Nonidet[®] P-40, 1% SDS) und 1/10 Volumen Proteinase K (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 18 h bei 60°C, dabei wurden die Reaktionsgefäße zur Verbesserung der Gewebelyse alle 30 min für 5 min bei 1000 U/min geschüttelt.

Die RNA-Extraktion konnte für das FFPE-Gewebe der Weißbüschelaffen erst nach dieser Vorbehandlung stattfinden. Die gefrorenen Gewebeproben der Mäuse konnten hingegen direkt verwendet werden, es wurde keine Trennung der weißen und grauen Substanz des Rückenmarks vorgenommen.

Die RNA-Extraktion wurde mit dem miRNeasy Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Einzige Abweichung war die Verwendung von RNeasy micro spin columns (Qiagen, Deutschland), um einen hohen RNA-Ertrag zu sichern. Zunächst wurden die Gewebeproben mit einer auf Phenol und Guanidinthiocyanat basierenden Lösung und durch mechanische Einwirkung homogenisiert. Durch die Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation erfolgte die Phasentrennung in drei Phasen. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und zur Bindung der RNA mit 100%igem Ethanol versetzt. Die nachfolgenden Waschungen dienten der Reinigung der RNA. Im letzten Schritt wurde die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert (Qiagen 2007).

Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch mit dem NanoDrop[®] (Thermo scientific, Braunschweig, Deutschland) bestimmt. Die isolierte RNA wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.6 qPCR-TaqMan LDAs

In einem ersten Versuch wurden Rückenmarksgewebeproben von vier EAE-Mäusen und drei nicht-immunisierten Kontrollmäusen untersucht. Die miRNAs wurden mit Hilfe von TaqMan microRNA Reverse Transkription Kit und miRNA-spezifischen haarnadelförmigen Primern (*stem-looped primers*) (beides Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) in eine cDNA transkribiert. Durch die Anlagerung der haarnadelförmigen Primer an die miRNA ist es möglich in der reversen Transkription cDNA-Transkripte zu generieren, die in der normalen qPCR vervielfältigt werden können (Chen et al. 2005). Für die qPCR wurden das qPCR Core Kit, Uracil N-Glykosylase (UNG) (beides Eurogentec, Köln, Deutschland) und TaqMan Low-Density Arrays (LDAs) (Applied Biosystems, Deutschland) verwendet. Mit den LDAs können mittels qPCR Expressionslevel von 586 einzelnen miRNAs detektiert werden. 288 miRNAs wurden mit einem CT-Wert (*cycle threshold*, Zyklusschwellenwert) unter 30 ($CT < 30$) auf den LDAs gemessen. Für die Analyse der Daten wurde der Median CT-Wert dieser 288 am höchsten exprimierten miRNAs als Ersatzreferenzgen (ERG) festgelegt (Junker et al. 2009). Die relative Expression der einzelnen miRNAs in den EAE-Läsionen im Vergleich zum Kontrollgewebe konnte dann mit der ΔCT -Methode berechnet werden: $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ EAE-Läsionen} - \Delta CT \text{ Kontrollgewebe}$. Dabei entspricht ΔCT EAE-Läsionen dem Median CT des ERG in den EAE-Läsionen minus dem Median CT der miRNA in den EAE-Läsionen und ΔCT Kontrollgewebe dem Median CT des ERG im Kontrollgewebe minus dem Median CT der miRNA im Kontrollgewebe. Die Regulation (x-fache Expression) ergibt sich aus der Potenz des $\Delta\Delta CT$ -Werts zur Basis 2 ($2^{\Delta\Delta CT}$).

2.7 qPCR-Einzelreaktionen

Anhand der bereits bekannten miRNA-Expression und -Regulation in aktiven humanen MS-Läsionen (Junker et al. 2009) wurden 14 miRNAs ausgewählt, die in der vorliegenden Arbeit in den Tiergewebeproben mit qPCR-Einzelreaktionen näher analysiert werden sollten. Die so ausgewählten miRNAs waren in den aktiven MS-Läsionen im Vergleich zum Kontrollgewebe entweder mindestens 3,5fach hoch- (acht miRNAs) oder herabreguliert (eine miRNA) oder im Vergleich zum Kontrollgewebe gar nicht reguliert (fünf miRNAs) (Daten basierend auf Junker et al. 2009). Die reverse Transkription wurde wie oben für die LDAs beschrieben durchgeführt. Für die qPCR-Einzelreaktionen wurden dann das qPCR Core Kit, UNG (beides Eurogentec, Deutschland) und single TaqMan miRNA Assays (Applied Biosystems, Deutschland) verwendet. Für die Detektion der miRNA-Expression wurde für jede qPCR-Einzelreaktion jeweils 1 ng transkribiertes RNA-Äquivalent/cDNA eingesetzt.

Zur Bestimmung der miRNA-Expression der Weißbüschelaffen wurde die snRNA (*small nuclear RNA*) RNU6B als Referenzgen verwendet. Die miRNA-Expression der Mäuse wurde mit Hilfe

von vier Referenz-miRNAs bestimmt, die im LDA-Experiment nicht reguliert erschienen (Median der CT-Werte von miR-135b, miR-125a-3p, miR-132 und miR-491 in allen Proben).

Alle Reaktionen wurden im Duplikat durchgeführt, zur weiteren Berechnung wurde der Mittelwert beider Ergebnisse verwendet. Die relative Expression der einzelnen miRNAs in den EAE-Läsionen im Vergleich zum Kontrollgewebe wurde mit der ΔCT -Methode berechnet ($\Delta\Delta\text{CT}$ = siehe 2.6).

2.8 Menschliche Gewebeproben

In der Studie von Junker und Kollegen wurden die miRNA-Expressionsprofile von 16 aktiven MS-Läsionen und neun Kontrollgewebeproben erstellt (Junker et al. 2009). Diese Daten dienen als Grundlage für den miRNA-Expressionsvergleich von MS-Läsionen und EAE-Läsionen der Tiermodelle.

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2010. Der Mann-Whitney-U-Test wurde zur Bestimmung der Übereinstimmung zweier nicht normalverteilter, unabhängig ermittelter Verteilungen angewendet. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$. Die Korrelation zwischen der miRNA-Regulation in humanen MS-Läsionen und den EAE-Läsionen der Tiermodelle wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet.

3 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

3.1 Histopathologische Auswertung der Entzündungsläsionen

Für die lichtmikroskopische Auswertung wurden an den Gewebeproben der Weißbüschelaffen (FFPE) und der C57BL/6-Mäuse (Gefrierschnitte) Standardfärbungen mit HE und LFB-PAS und immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CD3, MRP14 (Weißbüschelaffen) und Mac3 (Mäuse) durchgeführt.

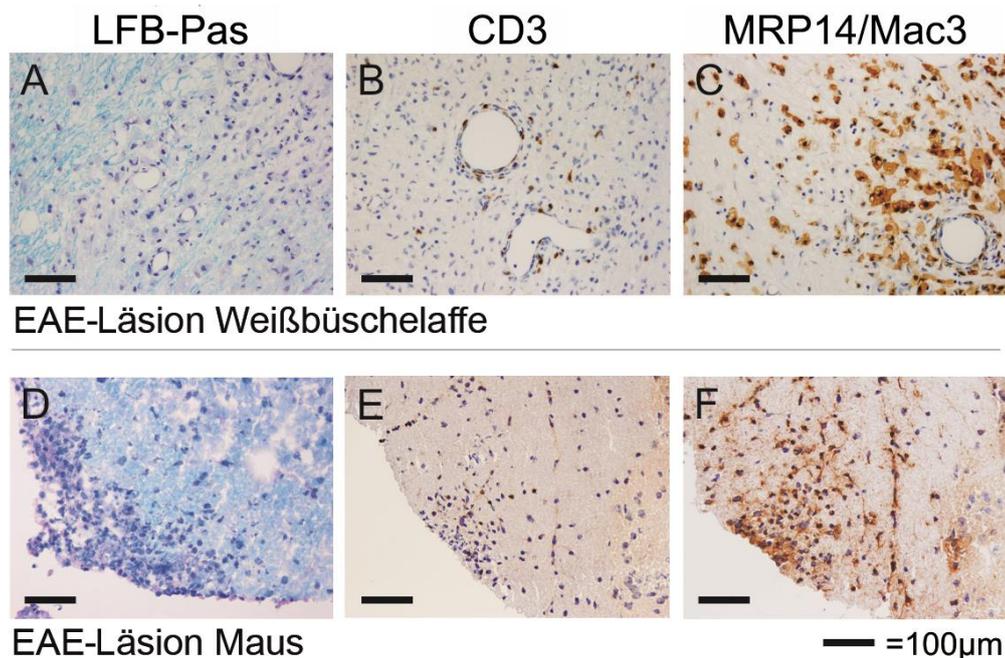


Abbildung 1: Histologische Färbung der analysierten EAE-Läsionen. Die FFPE-Gewebeproben (Weißbüschelaffen) und das Gefriermaterial (Mäuse), welche aktive EAE-Läsionen enthalten, wurden parallel mit LFB-PAS zur Darstellung von Myelin und Makrophagen, Antikörpern gegen CD3 zur Darstellung von T-Zellen sowie Antikörpern gegen MRP14 (Weißbüschelaffen) bzw. Mac3 (Mäuse) zur Darstellung von Makrophagen gefärbt. Die Demyelinisierung in den aktiven Läsionen ist durch die LFB-PAS-Färbung in (A) für Weißbüschelaffen und in (D) für Mäuse dargestellt. Die T-Zellinfiltration wird in (B) für Weißbüschelaffen und in (E) für Mäuse gezeigt. Die Läsionen sind stark von Makrophagen infiltriert, was in (C) für Weißbüschelaffen und in (F) für Mäuse sichtbar ist. Die FFPE-Schnitte waren 3 µm dick und die Gefrierschnitte waren 7 µm dick (Lescher et al. 2012).

Die histologischen EAE-Präparate der Weißbüschelaffen zeigen in der LFB-PAS-Färbung in der weißen Substanz große, teils konfluierende Läsionen, die größtenteils perivaskulär akzentuiert sind. Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbungen können im Entzündungsinfiltrat vor allem große Mengen aktivierte Makrophagen und Mikroglia (Färbung mit Antikörpern gegen MRP14) und in etwas kleinerem Umfang T-Zellen (Färbung mit Antikörpern gegen CD3) dargestellt

werden (Abb. 1). Die meisten Läsionen sind früh aktiv, aber es konnten auch kleine Bereiche mit inaktiven Läsionen identifiziert werden.

Die durch MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE-Läsionen im Rückenmark der Mäuse sind vor allem in der weißen Substanz lokalisiert, assoziiert mit entzündlichem Infiltrat in den Meningen. Die Läsionen zeigen Demyelinisierung (LFB-PAS-Färbung), aktivierte Makrophagen und Mikroglia (Färbung mit Antikörpern gegen Mac3) und, teilweise perivaskulär akzentuiert, einige T-Zellen (Färbung mit Antikörpern gegen CD3) (Abb. 1).

Das Entzündungsinfiltrat, repräsentiert durch Makrophagen, Mikroglia und T-Zellen, in den EAE-Läsionen der Tiermodelle ist weitgehend mit aktiven MS-Läsionen vergleichbar. Auch die Demyelinisierung der EAE-Läsionen in Weißbüschelaffen ist mit den humanen MS-Läsionen vergleichbar. Die Läsionen der Weißbüschelaffen gleichen, wie auch bereits in der Literatur beschrieben (Merkler et al. 2006a), im Wesentlichen Muster II-Läsionen beim Menschen. Im Gegensatz dazu zeigen die EAE-Läsionen im Rückenmark der Mäuse eine weniger starke Demyelinisierung als diese in MS-Läsionen zu finden ist.

3.2 MiRNA-Regulation in EAE in Mäusen und Weißbüschelaffen ähnelt jener in humanen MS-Läsionen

3.2.1 MiRNA-Regulation in EAE-Rückenmarksläsionen von Mäusen

Aus den Gewebeproben (Gefriermaterial) der Mäuse wurde zunächst die RNA extrahiert. Im ersten Versuch wurden dann in einer kleinen Versuchsgruppe (vier EAE-Mäuse, drei nicht-immunisierte Kontrollmäuse) qPCRs mit TaqMan LDAs durchgeführt. Von den möglichen 586 einzelnen miRNAs konnten 408 detektiert werden, 288 davon mit einem CT-Wert unter 30 (CT<30). Nach Normalisierung gegen ein ERG erschienen 38 miRNAs in den EAE-Läsionen im Gegensatz zum Kontrollgewebe mindestens 2fach hochreguliert und 41 miRNAs wenigstens auf die Hälfte herabreguliert.

Das miRNA-Expressionsprofil ($\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte) der MOG₃₅₋₅₅-EAE-Mäuse wurde dann mit einzelnen, in aktiven MS-Läsionen signifikant regulierten miRNAs verglichen (Daten aus Junker et al. 2009). Es zeigte sich, dass die in aktiven MS-Läsionen besonders stark regulierten miRNAs auch im Tiermodell reguliert erscheinen.

Zur Festigung und genaueren Differenzierung dieser Daten wurde die Versuchsgruppe im Hauptversuch vergrößert. Mit qPCR-Einzelreaktionen wurden im Rückenmark von 17 EAE-Mäusen und zehn Kontrollmäusen die miRNA-Expression von 14 ausgewählten miRNAs gemessen. Anhand der Daten der miRNA-Regulation in aktiven MS-Läsionen (Daten aus Junker et al. 2009) wurden miRNAs gewählt, die im Menschen entweder mindestens 3,5fach hoch- (acht miRNAs) oder herabreguliert (eine miRNA) oder im Vergleich zum Kontrollgewebe gar nicht reguliert (fünf miRNAs) waren.

Tabelle 1: Regulation von ausgewählten miRNAs in aktiven humanen MS-Läsionen im Vergleich zu EAE-Läsionen von Maus und Weißbüschelaffe (Lescher et al. 2012).

miRNAs ^a	Mensch		Maus		Weißbüschelaffe	
	x-fache Regulation in Läsionen im Vergleich zur Kontrolle ^b		x-fache Regulation in Läsionen im Vergleich zur Kontrolle ^c		x-fache Regulation in Läsionen im Vergleich zur Kontrolle ^d	
miR-155	11,9	**	17,0	**	8,0	**
miR-326	8,9	**	1,7	**	1,0	--
miR-142-3p	7,7	**	26,8	**	16,7	**
miR-146a	6,3	**	3,0	**	4,7	**
miR-146b	5,0	**	2,9	**	4,1	**
miR-34a	4,9	**	1,5	--	1,3	--
miR-21	3,9	**	10,8	**	4,4	**
miR-23a	3,9	**	4,3	--	2,0	--
miR-184	0,2	**	2,5	**	1,3	--
miR-135b	0,9	--	0,9	--	0,6	--
miR-125a-5p	1,0	--	1,2	--	0,8	--
miR-132	0,7	--	1,0	--	0,4	**
miR-491	1,0	--	1,2	--	0,5	**
miR-19a	1,2	--	2,5	**	1,7	**

Die x-fache Regulation ergibt sich aus der Potenz des $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werts zur Basis 2 ($2^{\Delta\Delta\text{CT}}$)

$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT EAE-Läsionen} - \Delta\text{CT Kontrollgewebe}$

^a Auswahl von regulierten (mindestens 3,5fach hoch- oder herabreguliert) und nicht regulierten miRNAs in aktiven humanen MS-Läsionen im Vergleich zu Kontrollgewebe (Daten aus Junker et al. 2009)

^b 16 aktive humane MS-Läsionen und 9 Kontrollgewebe wurden untersucht (Daten aus Junker et al. 2009)

^c 17 Maus-EAE-Rückenmarksläsionen und 10 Kontrollgewebe wurden untersucht

^d 10 Weißbüschelaffen-EAE-Läsionen und 6 Kontrollgewebe wurden untersucht

** $p < 0,05$ signifikanter Unterschied in der miRNA-Regulation zwischen aktiven Läsionen und Kontrollgewebe (U-Test)

-- kein signifikanter Unterschied in der miRNA-Regulation zwischen aktiven Läsionen und Kontrollgewebe (U-Test)

Der miRNA-Regulationsvergleich wurde anhand des Wertes $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$ durchgeführt (Tab. 1). In den EAE-Läsionen der Mäuse sind sechs der acht im Menschen hochregulierten miRNAs in ähnlicher Weise signifikant hochreguliert wie in den MS-Läsionen (miR-155, miR-326, miR-142-3p, miR-146a, miR-146b und miR-21). Die genauen Expressionslevel unterscheiden sich aber. MiR-142-3p ist beispielsweise in Mäusen sehr viel höher exprimiert (26,8fach) als im Menschen (7,7fach). MiR-23a zeigt eine nicht signifikante Hochregulation (4,3fach) und miR-34a zeigt nur eine leichte, nicht signifikante Tendenz zur Hochregulation (1,5fach). Die einzige untersuchte miRNA, die im Menschen herabreguliert ist (miR-184, 0,2fach), erscheint in der EAE-Läsion von Mäusen signifikant hochreguliert (2,5fach). Vier der fünf nicht regulierten miRNAs in den MS-Läsionen sind auch in Mäusen nicht reguliert (miR-135b, miR-125a-5p, miR-132 und miR-491). Im Gegensatz dazu erscheint die miR-19a in den EAE-Läsionen signifikant 2,5fach hochreguliert (Tab. 1).

Die Korrelation zwischen der miRNA-Regulation in MS-Läsionen und der miRNA-Regulation in EAE-Läsionen von Mäusen zeigt einen deutlichen Zusammenhang (Spearman's Rangkorrelationskoeffizient $r_s = 0,67$; $p < 0,01$) (Abb. 2).

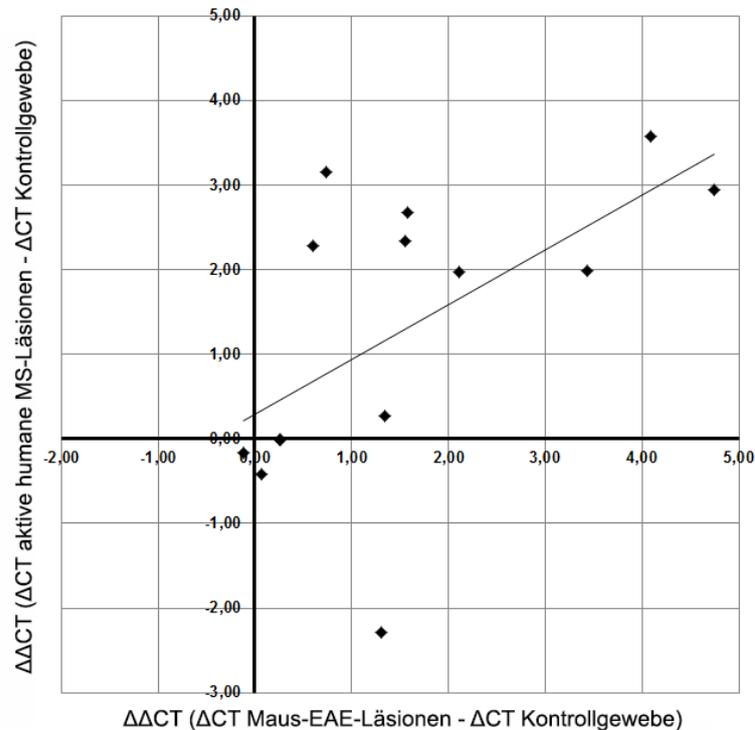


Abbildung 2: MiRNA-Expression in Maus-EAE-Läsionen im Vergleich zur miRNA-Expression in humanen MS-Läsionen. Die mit qPCR-Einzelreaktionen (single TaqMan miRNA Assays, Applied Biosystems) gemessenen hoch- und herabregulierten miRNAs in EAE-Rückenmarksläsionen von Mäusen sind mit ihren korrespondierenden miRNAs in aktiven MS-Läsionen (Daten aus Junker et al. 2009) dargestellt. Der X-Wert jedes Punktes stellt die Regulation einer spezifischen miRNA in Maus-EAE-Rückenmarksläsionen im Vergleich zum Kontrollgewebe dar [$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT EAE-Läsionen (Median CT Ersatzreferenzgen in EAE-Läsionen)} - \Delta\text{CT Kontrollgewebe (Median CT Ersatzreferenzgen im Kontrollgewebe)} - \Delta\text{CT Kontrollgewebe (Median CT Ersatzreferenzgen im Kontrollgewebe)} - \text{Median CT miRNA im Kontrollgewebe}$)]. Der Y-Wert jedes Punktes stellt die Regulation derselben miRNA in aktiven humanen MS-Läsionen im Vergleich zum Kontrollgewebe dar [$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT MS-Läsionen (Median CT Ersatzreferenzgen in MS-Läsionen)} - \text{Median CT miRNA in MS-Läsionen} - \Delta\text{CT Kontrollgewebe (Median CT Ersatzreferenzgen im Kontrollgewebe)} - \text{Median CT miRNA im Kontrollgewebe}$)].

3.2.2 MiRNA-Regulation in EAE-Läsionen von Weißbüschelaffen

Die Gewebeproben der Weißbüschelaffen (FFPE) wurden zuerst deparaffiniert und lysiert, dann erfolgte die RNA-Extraktion. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Extraktion von RNA und die anschließende quantitative miRNA-Detektion (qPCR) für Gefriermaterial und FFPE-Gewebeproben gleichwertige Ergebnisse liefert (Eisele et al. 2012; Junker et al. 2009).

Die zehn aktiven EAE-Läsionen und die sechs NAWM-Gewebeproben wurden mit qPCR-Einzelreaktionen auf ihre miRNA-Expression untersucht. Die miRNA-Regulation wird durch den Wert $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$ angegeben (Tab. 1). Im Vergleich zur miRNA-Regulation in aktiven MS-Läsionen zeigt sich, dass in den EAE-Läsionen der Weißbüschelaffen fünf der acht im Menschen hochregulierten miRNAs signifikant ähnlich hoch reguliert sind (miR-155, miR-142-3p, miR-146a, miR-146b und

miR-21). MiR-23a ist in den Weißbüschelaffen nicht signifikant 2fach hochreguliert. Im Gegensatz zu den MS-Läsionen sind in den EAE-Läsionen der Weißbüschelaffen die miR-326 und die miR-34a nicht reguliert. MiR-184, die in MS-Läsionen signifikant herabreguliert ist, ist in den Weißbüschelaffen nicht reguliert. Von den fünf in MS-Läsionen nicht regulierten miRNAs sind in den EAE-Läsionen zwei nicht reguliert (miR-135b und miR-125a-5p). Die anderen drei sind signifikant reguliert. MiR-19a ist signifikant 1,7fach hochreguliert und miR-132 und miR-491 sind in den EAE-Läsionen der Weißbüschelaffen signifikant herabreguliert (0,4fach und 0,5fach) (Tab. 1).

Die Korrelation zwischen der miRNA-Regulation in MS-Läsionen und der miRNA-Regulation in EAE-Läsionen von Weißbüschelaffen zeigt einen deutlichen Zusammenhang (Spearman's Rangkorrelationskoeffizient $r_s = 0,69$; $p < 0,01$) (Abb. 3).

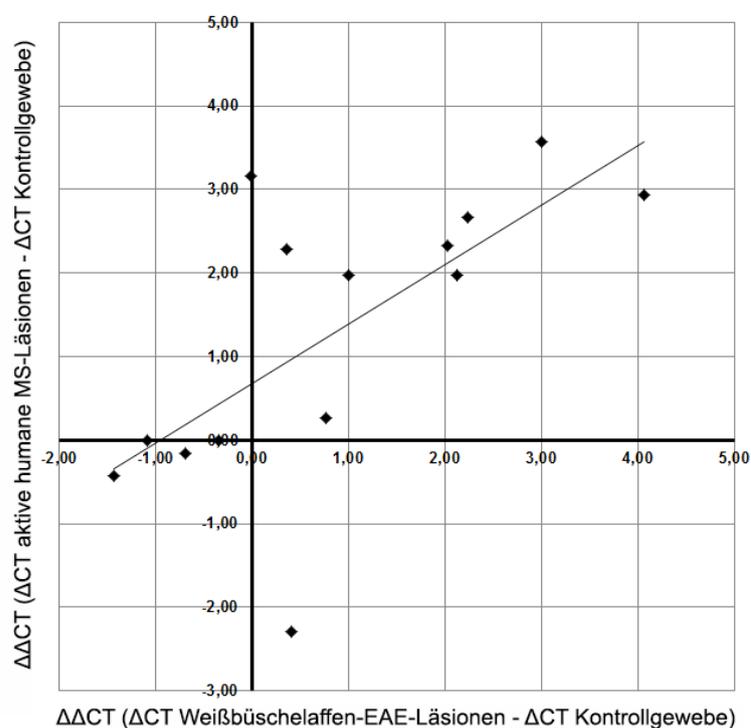


Abbildung 3: MiRNA-Expression in Weißbüschelaffen-EAE-Läsionen im Vergleich zur miRNA-Expression in humanen MS-Läsionen. Die mit qPCR-Einzelreaktionen (single TaqMan miRNA Assays, Applied Biosystems) gemessenen hoch- und herabregulierten miRNAs in EAE-Läsionen von Weißbüschelaffen sind mit ihren korrespondierenden miRNAs in aktiven MS-Läsionen (Daten aus Junker et al. 2009) dargestellt. Der X-Wert jedes Punktes stellt die Regulation einer spezifischen miRNA in Weißbüschelaffen-EAE-Läsionen im Vergleich zum Kontrollgewebe dar [$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT EAE-Läsionen (Median CT Referenzgen in EAE-Läsionen)} - \Delta\text{CT Kontrollgewebe (Median CT Referenzgen im Kontrollgewebe)} - \text{Median CT miRNA im Kontrollgewebe}$)]. Der Y-Wert jedes Punktes stellt die Regulation derselben miRNA in aktiven humanen MS-Läsionen im Vergleich zum Kontrollgewebe dar [$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT MS-Läsionen (Median CT Ersatzreferenzgen in MS-Läsionen)} - \text{Median CT miRNA in MS-Läsionen}$] - $\Delta\text{CT Kontrollgewebe (Median CT Ersatzreferenzgen im Kontrollgewebe)} - \text{Median CT miRNA im Kontrollgewebe}$)].

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die miRNA-Regulation ausgewählter miRNAs in EAE-Läsionen von C57BL/6-Mäusen (MOG₃₅₋₅₅-induziert) und Weißbüschelaffen (MOG₁₋₁₂₅-induziert) im Gegensatz zu Kontrollgewebe ermittelt und mit der miRNA-Regulation in aktiven humanen MS-Läsionen verglichen. Die meisten miRNAs waren in ähnlicher Weise hoch- oder herabreguliert wie in den MS-Läsionen.

Die möglichen Funktionen der einzelnen in den EAE- und MS-Läsionen regulierten miRNAs wurden bereits in der Veröffentlichung des Projektes detailliert dargestellt (Lescher et al. 2012). An dieser Stelle soll daher ergänzend dazu der potentielle Nutzen der in der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse diskutiert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die in aktiven humanen MS-Läsionen am höchsten regulierten miRNAs (miR-155, miR-142-3p, miR-146a, miR-146b und miR-21) auch in den Tiermodellen hochreguliert erscheinen. Daraus kann gefolgert werden, dass die Immunmechanismen, die in den Läsionen von miRNAs reguliert werden, in Menschen und in den beiden untersuchten Tiermodellen zumindest teilweise vergleichbar sind. MiR-155 spielt nachweislich eine proinflammatorische Rolle in verschiedenen Zelltypen. Im Tiermodell führt die Anwesenheit von miR-155 zu einer stärkeren Gewebeentzündung in den EAE-Läsionen (O'Connell et al. 2010b). Außerdem konnte in verschiedenen *in vitro*-Untersuchungen gezeigt werden, dass miR-155 und miR-146a nach Stimulation mit verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen in Astrozyten hochreguliert erschienen (Junker et al. 2009; Mor et al. 2011). MiR-146a und miR-146b übernehmen sowohl im angeborenen als auch im adaptiven Immunsystem regulatorische Funktionen (Rusca und Monticelli 2011). In Modellen verschiedener Krankheiten konnte gezeigt werden, dass miR-146a im Entzündungszustand in Astrozyten hochreguliert wird (Lescher et al. 2012). Außerdem spielt miR-146a eine wichtige Rolle in der Funktion von T_{reg}-Zellen (Lu et al. 2010).

Die EAE ist ein Tiermodell der MS, welches die Demyelinisierung beruhend auf einer autoimmunen Entzündungsreaktion, recht gut darstellt (Krishnamoorthy und Wekerle 2009). Es ist wahrscheinlich, dass ein Teil der gefundenen miRNA-Regulation in den EAE-Läsionen durch miRNAs aus Zellen des entzündlichen Infiltrats der Läsionen (v.a. Makrophagen, Mikroglia und T-Zellen) beeinflusst wird. Für die Demyelinisierung sind aber nicht nur Makrophagen, Mikroglia und T-Zellen verantwortlich, beispielsweise spielen auch Antikörper eine wichtige Rolle. Es wäre daher interessant, die miRNA-Expression in einem nicht-inflammatorischen Tiermodell der MS zu untersuchen und diese Ergebnisse dann mit der Regulation in den EAE-Läsionen und den MS-Läsionen zu vergleichen. Im Cuprizone-Modell kommt es zu einer toxisch induzierten Demyelin-

isierung und nachfolgender Axonschädigung. Makrophagen treten erst sekundär zur Phagozytose von Myelin und zur Reparatur der Läsionen auf. Aufgrund des reversiblen Effekts kann das Cuprizone-Tiermodell sehr gut für die Untersuchungen von De- und Remyelinisierungsvorgängen verwendet werden (Kipp et al. 2009). Im Cuprizone-Modell konnte durch mRNA-Quantifizierung gezeigt werden, dass die Myelinproteine MBP und MAG schon vor der eigentlichen Demyelinisierung herabreguliert werden und mit der Akkumulation von Makrophagen und Mikroglia wieder hochreguliert werden (Jurevics et al. 2002; Morell et al. 1998). Daher kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es auch eine spezifische miRNA-Regulation gibt, die an der Modulation der De- und Remyelinisierungsvorgänge beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die miRNA-Regulation in EAE-Läsionen größtenteils mit der miRNA-Regulation in humanen MS-Läsionen vergleichbar ist. Die meisten Untersuchungen zu miRNA-Expressionsprofilen in der MS wurden bisher im Blut durchgeführt. Vor allem die Untersuchung von Vollblut (Cox et al. 2010; Keller et al. 2009), Plasma (Siegel et al. 2012) und isolierten Monozyten oder Lymphozyten (Fenoglio et al. 2011; Martinelli-Boneschi et al. 2012; Otaegui et al. 2009; Paraboschi et al. 2011; Waschbisch et al. 2011) ist relativ einfach durchzuführen und kann daher klinisch sehr gut eingesetzt werden. Es stellt sich die Frage, ob auch im Tiermodell während der EAE miRNA-Veränderungen im Blut auftreten und ob diese ggf. als Prognose- und Krankheitsverlaufsmarker bei der MS dienen könnten.

MiRNAs spielen eine wichtige Rolle in der Genexpression und haben damit Einfluss auf viele physiologische Prozesse. Die Wirkungsweise vieler miRNAs ist noch nicht hinreichend geklärt, denn jede miRNA kann viele hundert Zielgene haben. Zur Identifizierung der miRNA-Ziele gibt es zum einen mehrere Programme, die anhand von Basensequenzen die Zielgene berechnen, zum anderen gibt es zur Bestätigung dieser Ergebnisse verschiedene experimentelle Ansätze (Thomson et al. 2011). Die miRNA-Zielidentifizierung kann ein Ansatz für das Verständnis physiologischer und im Falle von Erkrankungen auch pathologischer Prozesse sein. Da die miRNA-Expressionsprofile in der MS und der EAE von Mäusen und Weißbüschelaffen zumindest weitgehend vergleichbar sind, kann die EAE als gutes Modell für diese experimentellen Untersuchungen genutzt werden.

Ein experimenteller Ansatz zur miRNA-Zielidentifizierung ist die Untersuchung an gen-defizienten Mäusen, sogenannten Knockout-Mäusen, denen bestimmte miRNA-Prozessierungsfaktoren oder auch spezifische miRNAs fehlen. Im Tiermodell konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Fehlen von miR-155 zu einem weniger stark ausgeprägtem Krankheitsbild der EAE führt (Murugaiyan et al. 2011; O'Connell et al. 2010b).

Eine Unterdrückung bzw. Ausschaltung bestimmter für die Pathologie der Erkrankung bedeutsamen miRNAs kann einen therapeutischen Wert haben. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass dies prinzipiell möglich ist. So kann z.B. durch die intravenöse Gabe von sogenannten

AntimiRs eine spezifische miRNA gezielt unterdrückt werden. AntimiRs sind chemisch modifizierte zur reifen miRNA komplementäre (*antisense*) Oligonukleotide. Die chemische Modifikation kann unterschiedlich sein, sie dient immer der Stabilisierung und verbessert die Bindungsaffinität der AntimiRs. Durch die Bindung der AntimiRs an die entsprechende miRNA konkurrieren sie mit den Ziel-mRNAs und führen so zu einer funktionellen Inhibition der miRNA und Suppression der mRNA-Funktion.

An Mäusen und Primaten konnte gezeigt werden, dass AntimiRs in pharmakologischer Wirkung eingesetzt werden können. Die intravenöse Injektion von AntimiR-122 führte zu einer effektiven, spezifischen, langanhaltenden Unterdrückung von miR-122 in Hepatozyten und somit zu einer Reduktion der miR-122-abhängigen Gene, welches sich z.B. durch einen Abfall des Plasma-Cholesterin-Wertes zeigte. Es gab keine Anzeichen für eine AntimiR-assoziierte Toxizität oder histopathologische Veränderungen (Elmen et al. 2008; Krutzfeldt et al. 2005).

Auch die Replikation des Hepatitis-C-Virus (HCV) ist miR-122-abhängig. AntimiR-122 kann daher zur therapeutischen Behandlung bei chronischer Infektion mit HCV angewendet werden. Unter dem Produktnamen Miravirsen[®] (Santaris Pharma A/S, Hørsholm, Dänemark) wurden erste klinische Studien durchgeführt, die eine gut verträgliche, langanhaltende HCV-Suppression zeigten. Es traten keine dosisabhängigen Toxizitäten und nur geringfügige Nebenwirkungen auf (Stenvang et al. 2012).

Eine Behandlung mit AntimiR-16 führte im Tiermodell (Mäuse) zu einer Reduktion von miR-16 in allen getesteten Geweben (Leber, Niere, Herz, Fett, Duodenum und Knochenmark) außer im Hirngewebe (Krutzfeldt et al. 2005). Durch die direkte Injektion von AntimiR-16 in den Kortex konnte auch im Hirngewebe eine spezifische miRNA-Unterdrückung erreicht werden (Krutzfeldt et al. 2007). AntimiRs können daher auch als eine mögliche Therapieform für Erkrankungen des ZNS angesehen werden. Ein Problem stellt jedoch die Umgehung der Blut-Hirn-Schranke dar. In jedem Fall können aber im Tiermodell AntimiRs verwendet werden, um die Wirkung bzw. Funktion bestimmter miRNAs im ZNS zu ergründen.

Die meisten *in vivo*-Untersuchungen werden im Tiermodell durchgeführt. Nur in geringem Maße wird direkt am Menschen geforscht. Eine Vergleichbarkeit zwischen Krankheitsbild im Menschen und Tiermodell ist daher unabdingbar. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die MOG-induzierte EAE in Bezug auf miRNA-Regulation als entzündliches Modell der MS gut verwendet werden kann. Die in Untersuchungen zur EAE gewonnenen Erkenntnisse können daher diesbezüglich in wesentlichen Punkten als relevant für den Menschen angesehen werden.

5 Literaturverzeichnis

- Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP (2008): The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64-71
- Bartel DP (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297
- Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, Modena P, Facchinetti F, Calabro E, Croce CM, Pastorino U, Sozzi G (2011): MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3713-3718
- Charcot JM (1868): Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hôp Civils Milit (Paris)* 41, 554-555, 557-558, 566
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR (2005): Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33, e179
- Compston A, Coles A (2002): Multiple sclerosis. *Lancet* 359, 1221-1231
- Coolen M, Bally-Cuif L (2009): MicroRNAs in brain development and physiology. *Curr Opin Neurobiol* 19, 461-470
- Cox MB, Cairns MJ, Gandhi KS, Carroll AP, Moscovis S, Stewart GJ, Broadley S, Scott RJ, Booth DR, Lechner-Scott J (2010): MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. *PLoS One* 5, e12132
- Czech MP (2006): MicroRNAs as therapeutic targets. *N Engl J Med* 354, 1194-1195
- De Santis G, Ferracin M, Biondani A, Caniatti L, Rosaria TM, Castellazzi M, Zagatti B, Battistini L, Borsellino G, Fainardi E (2010): Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 226, 165-171
- Diem R, Demmer I, Boretius S, Merkler D, Schmelting B, Williams SK, Sattler MB, Bahr M, Michaelis T, Frahm J (2008): Autoimmune optic neuritis in the common marmoset monkey: comparison of visual evoked potentials with MRI and histopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 3707-3714
- Diener H-C, Weimar C: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Herausgegeben von der Kommission "Leitlinien" der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. 5. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2012
- Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, Li Z, Wu Z, Pei G (2009): MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol* 10, 1252-1259
- Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD (2004): Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3, 104-110
- Eacker SM, Dawson TM, Dawson VL (2009): Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 10, 837-841

- Ebers GC, Yee IM, Sadovnick AD, Duquette P (2000): Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. Canadian Collaborative Study Group. *Ann Neurol* 48, 927-931
- Eisele S, Krumbholz M, Fischer MT, Mohan H, Junker A, Arzberger T, Hohlfeld R, Bradl M, Lassmann H, Meinl E (2012): Prospects of Transcript Profiling for mRNAs and MicroRNAs Using Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Dissected Autoptic Multiple Sclerosis Lesions. *Brain Pathol* 10-3639
- Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjarn M, Hansen HF, Berger U (2008): LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452, 896-899
- Fenoglio C, Cantoni C, De RM, Ridolfi E, Cortini F, Serpente M, Villa C, Comi C, Monaco F, Mellesi L (2011): Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 504, 9-12
- Gale CR, Martyn CN (1995): Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 47, 425-448
- Geurts JJ, Barkhof F (2008): Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 7, 841-851
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006): miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34, D140-D144
- Guan H, Fan D, Mrelashvili D, Hao H, Singh NP, Singh UP, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2013): MicroRNA let-7e is associated with the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 43, 104-114
- Guerau-de-Arellano M, Smith KM, Godlewski J, Liu Y, Winger R, Lawler SE, Whitacre CC, Racke MK, Lovett-Racke AE (2011): Micro-RNA dysregulation in multiple sclerosis favours pro-inflammatory T-cell-mediated autoimmunity. *Brain* 134, 3578-3589
- 't Hart BA, van Meurs M, Brok HP, Massacesi L, Bauer J, Boon L, Bontrop RE, Laman JD (2000): A new primate model for multiple sclerosis in the common marmoset. *Immunol Today* 21, 290-297
- Haghikia A, Haghikia A, Hellwig K, Baraniskin A, Holzmann A, Decard BF, Thum T, Gold R (2012): Regulated microRNAs in the CSF of patients with multiple sclerosis: a case-control study. *Neurology* 79, 2166-2170
- Hebert SS, De Strooper B (2009): Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends Neurosci* 32, 199-206
- Hein T, Hopfenmüller W (2000): Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt* 71, 288-294
- Junker A, Krumbholz M, Eisele S, Mohan H, Augstein F, Bittner R, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R, Meinl E (2009): MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain* 132, 3342-3352
- Jurevics H, Largent C, Hostettler J, Sammond DW, Matsushima GK, Kleindienst A, Toews AD, Morell P (2002): Alterations in metabolism and gene expression in brain regions during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *J Neurochem* 82, 126-136
- Keller A, Leidinger P, Lange J, Borries A, Schroers H, Scheffler M, Lenhof HP, Ruprecht K, Meese E (2009): Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS One* 4, e7440

- Kerlero de Rosbo N, Milo R, Lees MB, Burger D, Bernard CC, Ben-Nun A (1993): Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Clin Invest* 92, 2602-2608
- Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009): The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol* 118, 723-736
- Kosik KS (2006): The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci* 7, 911-920
- Kozomara A, Griffiths-Jones S (2011): miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 39, D152-D157
- Krishnamoorthy G, Wekerle H (2009): EAE: an immunologist's magic eye. *Eur J Immunol* 39, 2031-2035
- Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M (2005): Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438, 685-689
- Krutzfeldt J, Kuwajima S, Braich R, Rajeev KG, Pena J, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M (2007): Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. *Nucleic Acids Res* 35, 2885-2892
- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W (2002): Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202-2212
- Kurtzke JF (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444-1452
- Kurtzke JF (1993): Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev* 6, 382-427
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002): Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-739
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001): An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862
- Lau P, Verrier JD, Nielsen JA, Johnson KR, Notterpek L, Hudson LD (2008): Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes. *J Neurosci* 28, 11720-11730
- Lee RC, Ambros V (2001): An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854
- Lescher J, Paap F, Schultz V, Redenbach L, Scheidt U, Rosewich H, Nessler S, Fuchs E, Gärtner J, Brück W (2012): MicroRNA regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice and marmosets resembles regulation in human multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 246, 27-33

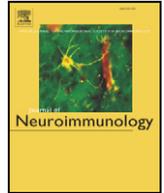
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20
- Lindberg RL, Hoffmann F, Mehling M, Kuhle J, Kappos L (2010): Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol* 40, 888-898
- Liston A, Lu LF, O'Carroll D, Tarakhovsky A, Rudensky AY (2008): Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *J Exp Med* 205, 1993-2004
- Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen CZ (2008): Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat Rev Immunol* 8, 120-130
- Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, Yoshimura A, Baltimore D, Rudensky AY (2010): Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 142, 914-929
- Lublin FD, Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907-911
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (1999): A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain* 122, 2279-2295
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707-717
- Martinelli-Boneschi F, Fenoglio C, Brambilla P, Sorosina M, Giacalone G, Esposito F, Serpente M, Cantoni C, Ridolfi E, Rodegher M (2012): MicroRNA and mRNA expression profile screening in multiple sclerosis patients to unravel novel pathogenic steps and identify potential biomarkers. *Neurosci Lett* 508, 4-8
- Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A (1995): A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 25, 1951-1959
- Merkler D, Schmelting B, Czeh B, Fuchs E, Stadelmann C, Brück W (2006a): Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset reflects the immunopathology of pattern II multiple sclerosis lesions. *Mult Scler* 12, 369-374
- Merkler D, Boscke R, Schmelting B, Czeh B, Fuchs E, Brück W, Stadelmann C (2006b): Differential macrophage/microglia activation in neocortical EAE lesions in the marmoset monkey. *Brain Pathol* 16, 117-123
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A (2008): Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10513-10518
- Mor E, Cabilly Y, Goldshmit Y, Zalts H, Modai S, Edry L, Elroy-Stein O, Shomron N (2011): Species-specific microRNA roles elucidated following astrocyte activation. *Nucleic Acids Res* 39, 3710-3723

- Morell P, Barrett CV, Mason JL, Toews AD, Hostettler JD, Knapp GW, Matsushima GK (1998): Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Mol Cell Neurosci* 12, 220-227
- Murugaiyan G, Beynon V, Mittal A, Joller N, Weiner HL (2011): Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 187, 2213-2221
- Nicoloso MS, Calin GA (2008): MicroRNA involvement in brain tumors: from bench to bedside. *Brain Pathol* 18, 122-129
- Noorbakhsh F, Ellestad KK, Maingat F, Warren KG, Han MH, Steinman L, Baker GB, Power C (2011): Impaired neurosteroid synthesis in multiple sclerosis. *Brain* 134, 2703-2721
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000): Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 938-952
- O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D (2010a): Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 10, 111-122
- O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, Kahn ME, Rao DS, Baltimore D (2010b): MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* 33, 607-619
- Otaegui D, Baranzini SE, Armananzas R, Calvo B, Munoz-Culla M, Khankhanian P, Inza I, Lozano JA, Castillo-Trivino T, Asensio A (2009): Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS One* 4, e6309
- Paraboschi EM, Solda G, Gemmati D, Orioli E, Zeri G, Benedetti MD, Salviati A, Barizzzone N, Leone M, Duga S (2011): Genetic association and altered gene expression of mir-155 in multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci* 12, 8695-8712
- Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL (2011): MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-alpha-PU.1 pathway. *Nat Med* 17, 64-70
- Qiagen - miRNeasy Mini Handbook: For purification of total RNA, including miRNA, from animal and human cells and tissues, 2007, 23-26
- Redell JB, Moore AN, Ward NH, III, Hergenroeder GW, Dash PK (2010): Human traumatic brain injury alters plasma microRNA levels. *J Neurotrauma* 27, 2147-2156
- Rieckmann P (2006): Immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose: Aktuelle Therapieempfehlungen (September 2006). *Nervenarzt* 77, 1506-1518
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004): Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14, 1902-1910
- Rusca N, Monticelli S (2011): MiR-146a in Immunity and Disease. *Mol Biol Int* 2011, 437301
- Saruhan-Direskeneli G, Weber F, Meinl E, Pette M, Giegerich G, Hinkkanen A, Epplen JT, Hohlfeld R, Wekerle H (1993): Human T cell autoimmunity against myelin basic protein: CD4+ cells recognizing epitopes of the T cell receptor beta chain from a myelin basic protein-specific T cell clone. *Eur J Immunol* 23, 530-536
- Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N (2008): Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58-63

- Siegel SR, Mackenzie J, Chaplin G, Jablonski NG, Griffiths L (2012): Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. *Mol Biol Rep* 39, 6219-6225
- Stenvang J, Petri A, Lindow M, Obad S, Kauppinen S (2012): Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence* 3, 1-3
- Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H (1998): Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8, 681-694
- Taganov KD, Boldin MP, Baltimore D (2007): MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity* 26, 133-137
- Thomson DW, Bracken CP, Goodall GJ (2011): Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res* 39, 6845-6853
- Tremlett H, Paty D, Devonshire V (2006): Disability progression in multiple sclerosis is slower than previously reported. *Neurology* 66, 172-177
- Vukusic S, Confavreux C (2007): Natural history of multiple sclerosis: risk factors and prognostic indicators. *Curr Opin Neurol* 20, 269-274
- Waschbisch A, Atiya M, Linker RA, Potapov S, Schwab S, Derfuss T (2011): Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression in relapsing remitting multiple sclerosis. *PLoS One* 6, e24604
- Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC (1989): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112, 133-146
- Wu GF, Alvarez E (2011): The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 29, 257-278
- Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA (1994): Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 179, 973-984
- Zhou X, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, McManus MT, Bluestone JA (2008): Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med* 205, 1983-1991

6 Kopie der Publikation

Lescher J, Paap F, Schultz V, Redenbach L, Scheidt U, Rosewich H, Nessler S, Fuchs E, Gärtner J, Brück W, Junker A (2012): MicroRNA regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice and marmosets resembles regulation in human multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 246, 27-33, mit Genehmigung des Elsevier Verlages



MicroRNA regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice and marmosets resembles regulation in human multiple sclerosis lesions

Juliane Lescher^a, Franziska Paap^a, Verena Schultz^a, Laura Redenbach^a, Uta Scheidt^a, Hendrik Rosewich^b, Stefan Nessler^a, Eberhard Fuchs^c, Jutta Gärtner^b, Wolfgang Brück^a, Andreas Junker^{a,*}

^a Department of Neuropathology, University of Göttingen, Göttingen, Germany

^b Department of Pediatrics and Pediatric Neurology, University of Göttingen, Göttingen, Germany

^c Clinical Neurobiology Laboratory, German Primate Center, Göttingen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 February 2012

Accepted 22 February 2012

Keywords:

MicroRNA

Multiple sclerosis

EAE

miRNA-155

miRNA-146a/b

Marmoset

ABSTRACT

Here we demonstrate that miRNA regulation in marmoset (*Callithrix jacchus*) and C57/BL6 mouse EAE lesions largely resembles miRNA regulation in active human MS lesions. Detailed quantitative PCR analyses of the most up- and downregulated miRNAs of active human MS lesions in dissected lesions from marmoset EAE brains and inflamed spinal cords of EAE mice revealed that the conserved and highly regulated miRNAs, miRNA-155, miRNA-142-3p, miRNA-146a, miRNA-146b and miRNA-21, turned out to be similarly upregulated in marmoset and mouse EAE lesions.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are small (~22 bp) RNA fragments with regulatory functions on the translational level (Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008). Recently, new information about miRNA expression in multiple sclerosis (MS) and its animal models was uncovered and functions of these miRNAs have been defined (for review see Junker, 2011; Junker et al., 2011; Thamilarasan et al., 2012). The expression of more than one-third of all mammalian genes might be regulated by miRNAs (Lewis et al., 2005) and they might therefore serve as therapeutic targets (Krutzfeldt et al., 2005; Czech, 2006; Elmen et al., 2008).

It has become clear in recent years that human miRNAs are also highly conserved especially in other mammals (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). It is increasingly recognized that miRNAs play essential roles in the immune system (Taganov et al., 2007; Lodish et al., 2008; O'Connell et al., 2010b) and for correct function in the mature central nervous system (CNS) (Kosik, 2006; Coolen and Bally-Cuif, 2009). It was found that miRNAs are critical for the maintenance of immune tolerance, as can be seen in mice with a deletion of Dicer-mediated miRNA processing in regulatory T cells (T reg cells). These mice develop a fatal autoimmune

disease which is very similar to the autoimmune syndrome of animals with a complete deficiency of T reg cells (Liston et al., 2008; Zhou et al., 2008). miRNA-124 promotes microglia quiescence and inhibits the symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway (Ponomarev et al., 2011). Apart from this, inflammatory cytokines can regulate the expression levels of miRNAs in a distinct cell type as shown, for example, in astrocytes (Junker et al., 2009; Mor et al., 2011). Only recently, several studies have been published in which expression of miRNAs was measured in the peripheral blood of MS patients (Du et al., 2009; Keller et al., 2009; Otaegui et al., 2009; Cox et al., 2010; De Santis et al., 2010; Lindberg et al., 2010; Martinelli-Boneschi et al., 2012; Fenoglio et al., 2011; Guerau-de-Arellano et al., 2011; Waschbisch et al., 2011). Two studies examined expression profiles of miRNAs in the CNS of MS patients (Junker et al., 2009; Noorbakhsh et al., 2011). miRNA-155 was one of the most upregulated miRNAs in active human MS lesions (Junker et al., 2009) and is also upregulated in normal appearing white matter (NAWM) from the CNS of MS patients (Noorbakhsh et al., 2011). Mice with a deficiency of miRNA-155 develop less severe EAE than controls (O'Connell et al., 2010a; Murugaiyan et al., 2011). For example, the attenuation of EAE in miRNA-155 knockout mice was associated with a decrease in Th1 and Th17 responses in the CNS and peripheral lymphoid organs.

MS is an inflammatory disease of the CNS which leads to the formation of demyelinated plaques with glial scar formation and axonal loss (Noseworthy et al., 2000). The heterogeneity of MS lesions, including the inflammatory infiltrate, oligodendrocyte damage and

* Corresponding author at: Department of Neuropathology, University Medical Center, Georg August University Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen, Germany. Tel.: +49 551 398469; fax: +49 551 398472.

E-mail address: junker@med.uni-goettingen.de (A. Junker).

the extent of demyelination/remyelination or axonal loss, has recently been described (Lucchinetti et al., 1999; Kuhlmann et al., 2002). The detailed histopathological description of actively demyelinating MS lesions led to the definition of four distinct lesion patterns (Lucchinetti et al., 2000).

Several animal models displaying parts of the pathology of MS and CNS inflammation have now been established (for review see Krishnamoorthy and Wekerle, 2009). EAE induced with the myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide MOG_{35–55} in C57/BL6 mice is one common model for investigating the CNS inflammation. The striking features of this model are large acute inflammatory lesions within the spinal cord with a great number of infiltrating CD4⁺ T-cells and macrophages with demyelination. The inflammatory CNS lesions in mice with MOG_{35–55} EAE bear features that are comparable to human MS lesions. MOG_{1–125}-induced EAE in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) is a model of CNS inflammation which displays many parallels, with regard to the pathology of the lesions, when compared with active human MS lesions (Merkler et al., 2006b).

We asked whether miRNA regulation in two inflammatory animal models, namely the MOG_{35–55} peptide-induced EAE in mice and the MOG_{1–125}-induced EAE in marmosets, is comparable to the miRNA regulation of active human MS lesions. Here we show that the expression of the most upregulated miRNAs in MS largely resembles the miRNA expression in these two EAE models.

2. Material and methods

2.1. Tissue specimens of marmosets

In total, we analyzed 16 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples from marmoset brains. The group of marmoset tissue specimens comprised 10 FFPE blocks with EAE lesions and 6 control blocks derived from animals which did not develop any lesion pathology after immunization (n = 5) or did not receive any immunization at all (n = 1). Tissue samples originated from the Department of Neuropathology in Göttingen, Germany and were collected from previous projects (Merkler et al., 2006a; Merkle et al., 2006b; Diem et al., 2008). Briefly, marmosets had been immunized with recombinant protein (rMOG) corresponding to the N-terminal sequence of rat MOG (amino acids 1–125) in complete Freund's adjuvant (CFA) (Merkler, D. et al., 2006b). All experiments had been performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and had been approved by local authorities.

2.2. Tissue specimens of mice

MOG_{35–55} (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) was purchased from Princeton Biomolecules (Langhorne, PA, USA). Incomplete Freund's adjuvant (IFA) was prepared as a mixture of mannide monooleate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and paraffin oil (Merck, Darmstadt, Germany); CFA was obtained by mixing *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) at 5 mg/ml into IFA. For disease induction 20 C57/BL6 mice were immunized 128 s.c. in all four extremities with a total of 200 µg MOG_{35–55} in CFA. 300 ng pertussis toxin (PTX; List Biological Laboratories – Quadratech, Epsom, UK) in 300 µl sterile phosphate buffered saline (PBS) was given on the day of immunization and 48 h later. Ten non-immunized mice served as negative controls. Animals were weighed and scored daily for clinical signs of disease on a scale from 0 to 10. Scores were as follows: 0 = normal; 1 = reduced tone of tail; 2 = limp tail, impaired righting; 3 = absent righting; 4 = gait ataxia; 5 = mild paraparesis of hind limbs; 6 = moderate paraparesis; 7 = severe paraparesis or paraplegia; 8 = tetraparesis; 9 = moribund; and 10 = death (Wust et al., 2008). Mice that either developed a score above 6 or had EAE symptoms for more than 4 days were sacrificed.

All experiments were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and were approved by local authorities.

2.3. Macrodissection of marmoset lesions

Lesions of marmoset brain samples were extracted as described previously for human brain samples (Eisele et al., 2012; Junker et al., 2009). Briefly, paraffin sections were mounted on membrane-covered polyethylene naphthalate slides (Zeiss, Jena, Germany). Parallel sections were stained with hematoxylin–eosin (HE) and luxol fast blue–Pas (LFB–Pas) to allow identification of the lesions. For the analysis of miRNA profiles from lesions, white matter areas with inflammatory infiltrate were dissected from the slides with a scalpel and 10 sections (each 9 µm thick) were pooled for RNA extraction. Control white matter specimens were extracted the same way. This miRNA analysis was restricted to white matter tissue samples in order to limit possible confounding effects from neuronal miRNAs. FFPE tissue was deparaffinized and digested with proteinase K (Sigma-Aldrich) before RNA extraction.

2.4. Processing of spinal cord tissue of mice

Spinal cords of diseased mice or control mice were extracted and snap frozen for histochemistry and RNA preparation.

2.5. Histopathology

Histological evaluation was performed on 3 µm-thick sections stained with HE (data not shown) and LFB–Pas to assess inflammation and demyelination. Immunohistochemistry was performed after antigen-unmasking microwave treatment for 15 min (800 W) in citrate buffer. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation of sections in 3% H₂O₂ in PBS. Sections were blocked with 10% fetal calf serum in PBS for 10 min at room temperature. Washed sections were stained with the following primary antibodies: mouse anti-human MRP14 (1:500, BMA Biomedicals, Augst, Switzerland), mouse anti-human CD3 (1:50, Serotec, Düsseldorf, Germany), rat anti-mouse MAC3 – M3/84 (1:200, Pharmingen, Hamburg, Germany). Bound antibody was visualized using an avidin-biotin technique with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as chromogen.

2.6. RNA extraction

Tissue lysis and RNA extraction were performed according to the protocol previously published by Eisele et al. and Junker et al. (Eisele et al., 2012; Junker et al., 2009). FFPE tissue and frozen tissue are equally applicable for the detection of miRNAs as demonstrated before (Eisele et al., 2012; Junker et al., 2009).

For tissue lysis of FFPE specimens lysis buffer (50 mM Tris, 25 mM EDTA, 500 mM NaCl, 0.1% Nonidet® P-40, 1% SDS) in combination with 1/10 volume Proteinase K (Sigma-Aldrich) was added per reaction tube and incubated at 60 °C for 18 h. To improve tissue lysis reaction tubes were vortexed every 30 min at 1000 rpm for 5 min. RNA was isolated from the preprocessed FFPE specimens or directly from the frozen specimens using the miRNeasy mini-kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the protocol provided by the manufacturer. To obtain a higher yield of RNA, we used RNeasy microspin columns (Qiagen) RNA concentration was determined with the NanoDrop (Thermo scientific/Gerhard Menzel, Braunschweig, Germany). RNA was stored at –80 °C.

2.7. RT PCR – Taqman LDAs

Evaluation of miRNA profiles of mouse samples was performed as described previously for human miRNAs (Junker et al., 2009). Briefly, the investigated screening samples contained 4 EAE spinal cords and

3 control spinal cords from non-diseased mice. In total, the expression level of 586 single miRNAs was detected with LDAs on the ABI 7900 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). For analyses of mouse data the median of the most abundant 228 miRNAs (228 miRNAs could be detected with a raw cycle threshold (CT <30) in all samples) was used as a surrogate housekeeping gene as previously described (Junker et al., 2009). The relative expression of miRNAs in EAE lesions versus control tissue was calculated with the ΔCT method (Ng et al., 2009).

The qPCR single reactions were performed on the IQ5 (Biorad, Munich, Germany) using the qPCR Core Kit and uracyl N-glycosylase (both from Eurogentec, Cologne, Germany). miRNAs were detected with single TaqMan miRNA Assays (Applied Biosystems). The total amount of transcribed RNA equivalent used per PCR reaction was 1 ng for all miRNAs. In marmoset experiments, the small nuclear RNA RNU6B was used for normalization with the ΔCT method (Ng et al., 2009). Briefly, $\Delta\text{CT} = [(\text{median of CT miRNA lesions minus median CT RNU6B lesions}) \text{ minus } (\text{CT miRNA controls minus CT RNU6B controls})]$. In mice, RNU6B appeared to be upregulated in mouse EAE lesions when normalized against the amount of RNA equivalent used per qPCR reaction (data not shown). Therefore, 4 miRNAs which appeared not to be 214 regulated in the mouse LDA screening experiment (miRNA-135b, miRNA-125a-5p, miRNA-132, miRNA-491), were measured in each sample and the median raw CT value of all 4 was used for normalization as a surrogate housekeeping gene for this experiment.

The stability of the housekeeping gene or surrogate housekeeping gene in the examined samples is depicted in Supplementary Fig. 1.

2.8. Human samples

Evaluation of miRNA profiles of human samples was previously published and described in detail (Junker et al., 2009). In short, the investigated samples contained 16 active MS lesions and 9 normal brain white matter specimens (for details see Junker et al., 2009). In short, the investigated samples contained 16 active MS lesions and 9 normal brain white matter specimens (for details see (Junker et al., 2009)).

2.9. Statistical analysis

To assess whether two samples of independent observations varied in their composition, the Mann–Whitney U test was performed. The significance level was set to 5%. The correlation between miRNA regulation in human MS lesions and animal EAE lesions was calculated with Spearman's rank correlation.

3. Results

3.1. Histopathological analysis of the inflamed lesions

The inflammatory infiltrates in demyelinating white matter EAE lesions from marmosets mainly comprise activated macrophages/microglia (visualized with MRP14 antibody immunohistochemistry) and to a lesser extent CD3^+ T-cells (Fig. 1). In marmosets, myelin stain with LFB-Pas revealed large confluent demyelinating lesions (Fig. 1). The inflammatory infiltration was partially perivascularly accentuated. The majority of the plaques in marmosets were early active and only small areas of the hemispheres contained inactive lesion areas. Detailed analyses of the lesions revealed a histopathological pattern which resembled the pathology of MS pattern II lesions (Lucchinetti et al., 2000; Merkler, D. et al., 2006b).

Actively inflamed EAE lesions of mouse spinal cords displayed demyelination (stained with LFB-Pas) and accumulations of activated macrophages/microglia in meningeal and parenchymal localizations (stained with LFB-Pas and immunohistochemistry against Mac3 – Fig. 1). T cell infiltration (detected with antibodies against CD3) occurred in the parenchyma and perivascular area (Fig. 1).

Histological analysis of human MS lesions showed actively demyelinating plaques with an accumulation of activated macrophages and microglia together with a sparse T-cellular infiltration, often accentuated around vessels (Junker et al., 2009).

Infiltration by macrophages and T cells in the animal models resembled substantially active human MS lesions. Demyelination in marmoset EAE lesions is comparable to that in human MS lesions. In contrast, spinal cord EAE lesions in mice show less demyelination.

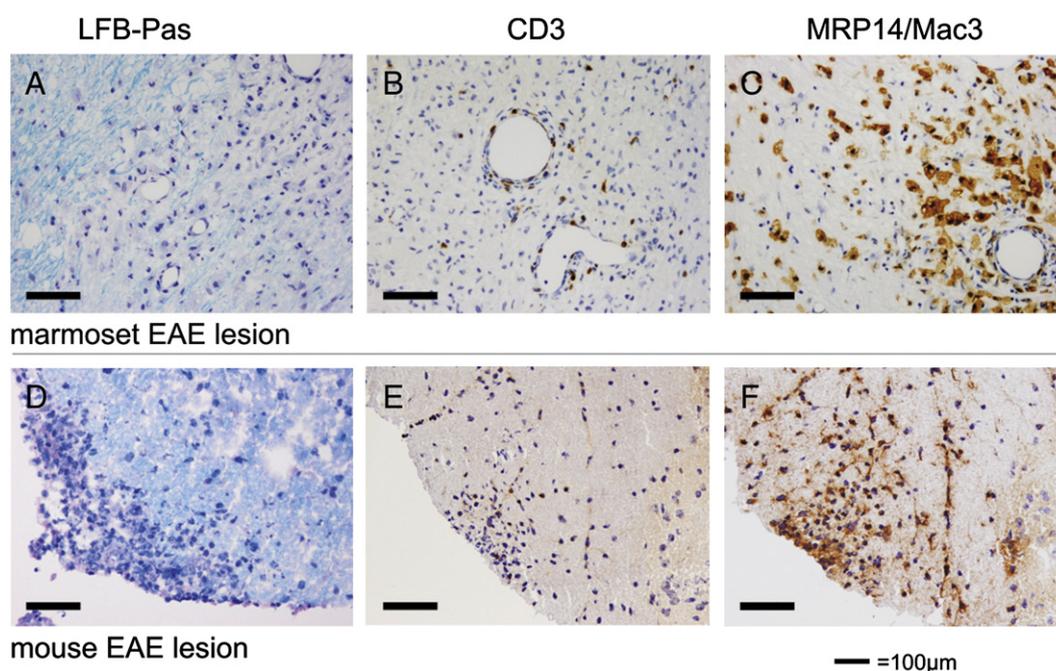


Fig. 1. Histology of analyzed lesions in animal models. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) (marmosets) or frozen (mice) tissue blocks containing active demyelinating lesions were stained in parallel for myelin and macrophages with luxol fast blue-Pas (LFB-Pas), CD3 for T cells and MRP14 (marmosets) or Mac3 (mice) for macrophage infiltration. Demyelination detected with LFB-Pas is depicted in (A) for marmosets and (D) for mice. T-cellular infiltration is visualized in (B) for marmosets and (E) for mice. Active lesions are densely populated with macrophages as shown in (C) for marmosets and (F) for mice. Paraffin sections were 4 μm thick, frozen sections were 7 μm thick.

3.2. Overexpressed miRNAs in human MS are partially upregulated in mouse and marmoset EAE lesions

3.2.1. miRNA regulation in spinal cords of mice with MOG_{35–55}-induced EAE

We performed screening experiments with qPCR (Taqman miRNA LDAs – Taqman Array Rodent miRNA Panels A and B) to determine the expression level of 586 single miRNAs in EAE mouse spinal cords and spinal cords of non-diseased mice. In this screening experiment, only a limited number of specimens (4 EAE spinal cords and 3 control spinal cords from non-diseased mice) were investigated. We could detect 408 miRNAs in the mouse spinal cords. Thirty-eight miRNAs appeared to be upregulated more than two-fold in inflamed spinal cords compared to spinal cords of non-diseased mice, and 41 miRNAs were downregulated by less than a factor of 0.5 in inflamed mouse spinal cords versus non-inflamed mouse spinal cords (for complete dataset, see Supplementary Table 1). We considered miRNA abundance in human tissue and mice spinal cords (CT <35) and compared the significantly ($p < 0.05$) regulated miRNAs of active human MS lesions with corresponding miRNAs from the qPCR – LDAs of inflamed spinal cords. We found that the regulation of human miRNAs in MS lesions partially overlapped with this animal model (Fig. 2 and Supplementary Table 2).

To confirm these results and to follow the hypothesis of partially convergent miRNA regulation in animal models and humans, we measured the expression of miRNAs with Taqman single miRNA assays (Applied Biosystems) in inflamed mouse spinal cords (17 specimens from different animals) and spinal cords from non-diseased mice (10 specimens from different animals).

All conserved miRNAs which were either upregulated 3.5 fold (8 miRNAs) or downregulated by less than a factor of 0.29 (1 miRNA) in the active human white matter MS brain lesions and a selection of

unregulated miRNAs (5 miRNAs) – based on our previous report (Junker et al., 2009) – were measured in inflamed spinal cord sections of mice with MOG_{35–55} peptide-induced EAE (Table 1). Six of the conserved miRNAs were likewise significantly upregulated in active mouse EAE lesions compared to controls (miRNA-155, miRNA-326, miRNA-142-3p, miRNA-146a, miRNA-146b and miRNA-21) (Table 1 and Supplementary Fig. 2). One miRNA showed a 4.3-fold upregulation which did not reach a level of significance (miRNA-23a). miRNA-34a showed a tendency towards upregulation (1.5 fold) in mouse EAE lesions which was also non-significant. miRNA-184, the only miRNA which was downregulated in human MS lesions by less than 0.29 fold and which is also conserved in mice, showed – in clear contrast to the human disease – a 2.5-fold upregulation. Of the 5 selected miRNAs in human MS lesions which were not regulated compared to controls (no significant differences between lesions and control tissue – Table 1), only 4 showed comparable results in mice (miRNA-135b, miRNA-125a-5p, miRNA-132 and miRNA-491). miRNA-19a, which was not regulated in human MS lesions, showed a 2.5-fold upregulation in mouse EAE spinal cords. Correlation between miRNA regulation in human MS lesions and miRNA regulation in mouse EAE lesions showed moderate correlation (Correlation coefficient $r = 0.67$; $p < 0.01$; Spearman's rank correlation).

Absolute regulation differs in the qPCR single assay investigations as compared to the LDA screening analyses. The expression levels of the screening experiment have only an indicative character due to the low sample size and could therefore not reach significant level.

3.2.2. miRNA regulation in marmoset EAE lesions

In marmoset tissue, 8 conserved miRNAs, which were upregulated more than 3.5 fold and 1 miRNA which was downregulated by less than 0.29 fold in active human MS lesions (Junker et al., 2009), were analyzed. Altogether we investigated 10 active white matter

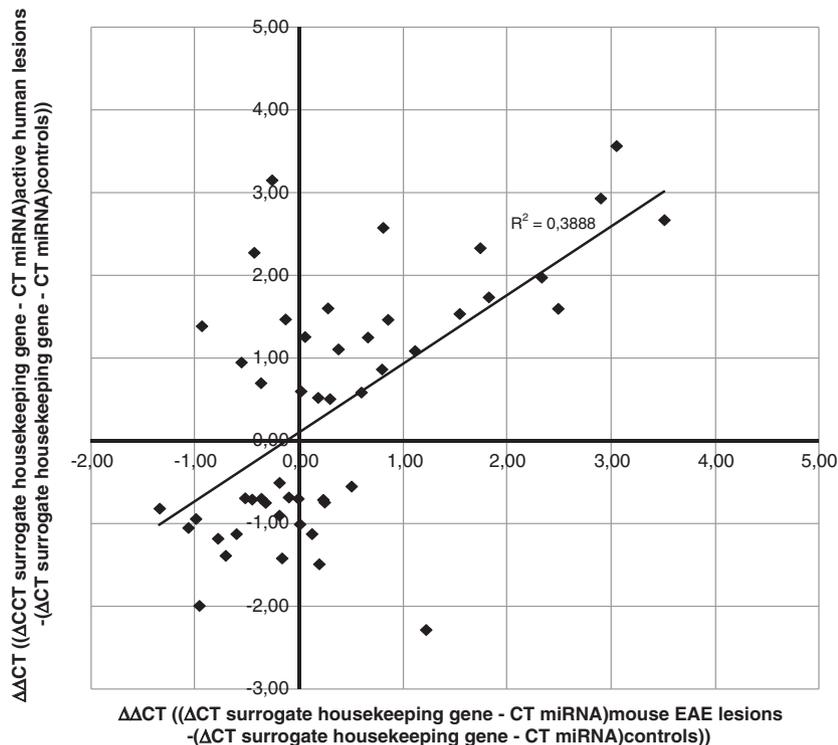


Fig. 2. miRNA expression in multiple sclerosis lesions in comparison to miRNA expression of mouse EAE lesions (screening experiment). Comparison of miRNAs up- or downregulated in active human lesions versus their corresponding miRNAs in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) spinal cords measured with Taqman Low Density Arrays (LDAs) (Applied Biosystems, Germany). The X-value of each dot represents the regulation of one specific miRNA in EAE lesions versus corresponding controls [$\Delta\Delta\text{CT value} = ((\Delta\text{CT surrogate housekeeping gene} - \text{CT miRNA}) \text{ mouse EAE lesions} - (\Delta\text{CT surrogate housekeeping gene} - \text{CT miRNA}) \text{ controls})$]. The Y-value of each dot represents the regulation of the same miRNA in active human MS lesions versus controls [$\Delta\Delta\text{CT value} = ((\Delta\text{CT surrogate housekeeping gene} - \text{CT miRNA}) \text{ MS lesions} - (\Delta\text{CT surrogate housekeeping gene} - \text{CT miRNA}) \text{ controls})$]. Values are listed in Supplementary Table 2. Coefficient of determination $R^2 = 0.389$.

Table 1
Regulation of selected miRNAs of active human multiple sclerosis lesions in comparison to mouse and marmoset EAE lesions.

miRNAs ^a	Human		Mouse		Marmoset	
	Fold regulation in lesions compared to control ^b		Fold regulation in lesions compared to control ^c		Fold regulation in lesions compared to control ^d	
miRNA-155	11.9	**	17.0	**	8.0	**
miRNA-326	8.9	**	1.7	**	1.0	– ^e
miRNA-142-3p	7.7	**	26.8	**	16.7	**
miRNA-146a	6.3	**	3.0	**	4.7	**
miRNA-146b	5.0	**	2.9	**	4.1	**
miRNA-34a	4.9	**	1.5	– ^e	1.3	– ^e
miRNA-21	3.9	**	10.8	**	4.4	**
miRNA-23a	3.9	**	4.3	– ^e	2.0	– ^e
miRNA-184	0.2	**	2.5	**	1.3	– ^e
miRNA-135b	0.9	– ^e	0.9	– ^e	0.6	– ^e
miRNA-125a-5p	1.0	– ^e	1.2	– ^e	0.8	– ^e
miRNA-132	0.7	– ^e	1.0	– ^e	0.4	**
miRNA-491	1.0	– ^e	1.2	– ^e	0.5	**
miRNA-19a	1.2	– ^e	2.5	**	1.7	**

^a Selection of regulated (up- or downregulated at least 3.5 fold) and unregulated miRNAs of active human MS lesions in comparison to normal brain white matter (adopted from Junker et al., 2009).

^b 16 active human MS lesions and 9 control white matter specimens were examined (adopted from Junker et al., 2009).

^c 17 mouse EAE spinal cord sections and 10 control specimens were examined.

^d 10 marmoset EAE lesions and 6 control white matter specimens were examined.

^e No significant difference in miRNA regulation between active lesions and control tissue (*U*-test).

** *p*<0.05 significant difference in miRNA regulation between active lesions and control tissue (*U*-test).

lesions from different animals and 6 white matter specimens from non-diseased animals. Five miRNAs were likewise significantly upregulated in active marmoset EAE lesions (miRNA-155, miRNA-142-3p, miRNA-146a, miRNA-146b, miRNA-21) (Table 1 and in detail in Supplementary Fig. 2). One showed a two-fold upregulation compared to controls which was not significant (miRNA-23a). miRNA-326 and miRNA-34a, in contrast to active human MS lesions, were not regulated in active marmoset EAE lesions. From the selected 5 miRNAs which showed no regulation in active human MS lesions, 3 showed a significant regulation in marmoset EAE lesions. miRNA-132 and miRNA-491 were significantly downregulated and miRNA-19a showed a significant upregulation. Correlation between miRNA regulation in human MS lesions and miRNA regulation in marmoset EAE lesions showed moderate correlation (Correlation coefficient $r = 0.68$; $p < 0.01$; Spearman's rank correlation). Technical replicates were performed and showed comparable results (data not shown). The absolute regulatory level of each single miRNA differs among the investigated species.

4. Discussion

We matched the miRNA regulation of the most upregulated miRNAs of human MS lesions with that in two different animal models for MS, namely the MOG_{35–55} peptide-induced EAE in C57/BL6 mice and the MOG_{1–125}-induced EAE in marmoset monkeys. The majority of the most regulated miRNAs of human active MS lesions are regulated in a similar direction in the two animal models.

The upregulation of miRNAs in active lesions compared to normal CNS tissue is caused, at least to some extent, by the cellular infiltration of T cells and macrophages. Another reason for the alteration in miRNA expression is presumably due to an upregulation of miRNAs in cells resident in the brain, such as astrocytes and microglia. Astrocytes are the most abundant glia cell type of the CNS and they play a key role in immune reactions (Farina et al., 2007). miRNA-155 and miRNA-146a/b are upregulated in active MS lesions of humans and

EAE lesions of mice and marmosets. Two of them, miRNA-155 and miRNA-146a, are upregulated in primary human astrocytes *in vitro* upon stimulation with interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Junker et al., 2009). After exposure to interferon- γ (IFN- γ) and lipopolysaccharide (LPS) *in vitro* miRNA-155, miRNA-146a and miRNA-146b are upregulated in primary astrocytes of mice (Mor et al., 2011). This could also be demonstrated for miRNA-155 and miRNA-146a in primary astrocytes of marmosets (Mor et al., 2011). miRNA-155, miRNA-34a and miRNA-326 target the immunomodulatory surface molecule CD47, which is downregulated in active and inactive MS lesions and which might enhance macrophage activity (Junker et al., 2009). This demonstrates that different upregulated miRNAs may share common target transcripts. To date, several studies have shown the proinflammatory role of miRNA-155 on diverse cell types. One of the properties of miRNA-155 is the promotion of T cell-dependent tissue inflammation. Mice with a deficiency of this miRNA are resistant to the development of active EAE (O'Connell, R. M. et al., 2010a).

miRNA-155 was identified as a component of macrophage/monocyte response to LPS, IFN- β , TNF- α and polyriboinosinic-polyribocytidylic acid (poly IC) (O'Connell et al., 2007; Tili et al., 2007). Moreover, miRNA-155 modulates the immune response in microglia by downregulating suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and increasing cytokine and NO production (Cardoso et al., 2011). This is of particular interest because much of the inflammatory infiltrate in the lesions consists of activated microglia and macrophages, and the activity of these cells seems to be crucial for the degree of devastation in the lesions (Benveniste, 1997; Sriram and Rodriguez, 1997; Platten and Steinman, 2005; Breijl et al., 2008).

Interestingly, miRNA-155 is also upregulated in NAWM of MS patients (Noorbakhsh et al., 2011). This is accompanied by suppressed expression of critical neurosteroidogenic enzymes (3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms), which are targeted by miRNA-338, miRNA-155 and miRNA-491 (Noorbakhsh et al., 2011). In that study, several miRNAs were also checked for their expression in EAE. miRNA-155 as well as miRNA-338-3p showed upregulation in EAE hindbrains compared with controls. miRNA-338-5p was not altered in EAE, whereas analysis of miRNA-183 and miRNA-491 revealed a non-significant increase in EAE compared with controls (Noorbakhsh et al., 2011). This is in line with our results, in which miRNA-155 shows a strong upregulation in EAE spinal cords and miRNA-491 does not show a significant regulation in EAE versus controls.

MiRNA-146a/b is involved in the regulation of the adaptive as well as the innate immune response (reviewed by Rusca and Monticelli, 2011) and might therefore play fundamental roles in astrocytes under inflammatory conditions. miRNA-146a was upregulated in reactive astrocytes from human hippocampal epilepsy biopsies and also in the hippocampus of a rat model of epilepsy (Aronica et al., 2010). Furthermore, this miRNA was increased in human Alzheimer's disease brain samples from the neocortex and hippocampus and *in vitro* in astrocytes treated with IL-1 β or amyloid- β -42 (A β 42) peptide (Cui et al., 2010). It was shown that Toll-like receptor and cytokine signaling are influenced by miRNA-146a, which targets the TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) and IL-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) genes in primary human astrocytes (Cui et al., 2010); this was previously shown in monocytes (Taganov et al., 2006). NF- κ B-sensitive miRNA-146a-mediated modulation of complement factor H gene expression may in part regulate an inflammatory response in Alzheimer's disease brain and in stressed human glial cells *in vitro* (Lukiw et al., 2008). In whole tissue miRNA analyses of MS lesions as well as of EAE lesions, miRNA-146a probably reflects the miRNA content of both parenchymal and infiltrating cells, where it also covers important regulatory functions. miRNA-146a is upregulated in Th1 and downregulated in Th2 T cells in mice and might contribute to determine the fate of these cells (Monticelli et

al., 2005). Furthermore, miRNA-146a is important for the function of T reg cells and a deficiency of this miRNA results in impaired T reg function with the breakdown of immunological tolerance, massive lymphocyte activation and tissue infiltration in several organs (Lu et al., 2010).

In our study we demonstrate that miRNA-326, upregulated in active human MS lesions (Junker et al., 2009), is also upregulated in mouse EAE lesions – but not in marmoset EAE lesions. Besides its potential regulatory function on CD47 in MS lesions (Junker et al., 2009), miRNA-326 expression in peripheral blood is correlated with disease severity in MS patients and EAE mice. Inhibition of miRNA-326 was shown to reduce EAE symptoms in mice by inhibiting Th17 cell differentiation through a T cell-intrinsic mechanism. It was shown that miRNA-326 targets Ets-1, a known negative regulator of Th17 cells (Du et al., 2009). miRNA-326, miRNA-155, miRNA-146a and miRNA-142-3p were overexpressed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) derived from patients with relapsing-remitting MS (RR-MS) and were expressed partially lower in glatiramer acetate (GA)-treated RR-MS patients (Waschbisch et al., 2011). Upregulation of miRNA-326 might be correlated to inflammatory activity in the CNS, because of its stronger upregulation in the brains of a subset of MS patients with the so-called Marburg variant of the disease (Junker et al., 2009). Marburg variant is a very aggressive form of MS with large and strongly inflamed brain lesions and a poor clinical prognosis (Hu and Lucchinetti, 2009).

The heterogeneity of the inflammatory infiltrate might also be the reason why miRNA-34a is not significantly regulated in the animal lesions as opposed to active human MS lesions. miRNA-34a is differentially expressed in human T cell subsets from patients with RR-MS (Lindberg et al., 2010) and the T-cellular infiltration differs in its composition between human MS lesions and both of the animal EAE models (Table 1). In humans, extended parts of the T-cellular infiltration of the lesions consist of CD8+ T-cells, which frequently outrange CD4+ T cells in number and which have a key role in the pathology of MS (reviewed by Saxena et al., 2011). Furthermore, grey matter in mouse spinal cords might contribute to a shift in miRNA expression, since only white matter lesions were analyzed in human MS (Junker et al., 2009) and marmoset specimens.

Another factor which might have influence on lesion pathology is the up- or downregulation of non-conserved miRNAs in human MS lesions compared to the animal models.

miRNA-650 is the most upregulated miRNA in active human MS lesions (Junker et al., 2009) and it is not conserved in mice or marmosets; the same is true for the non-conserved miRNA-656 which is downregulated in active human MS lesions (Junker et al., 2009) and does not occur in mice or marmosets (miRNA gene identifying algorithms see miRviewer <http://people.csail.mit.edu/akiezun/miRviewer/>). Targets of these non-conserved miRNAs might therefore not be affected in the animal models of MS.

Non-conserved binding sites might also lead to differences in the effects of miRNA in human MS or the animal models. miRNA-298 and miRNA-351, for example, are downregulated in mouse astrocytes and are specific to mice and rats (Mor et al., 2011). Thus the TNF- α 3' UTR binding site for miRNA-298 is conserved among most species, while the miRNA-351/miRNA-125b binding site is found in mice but not in primates (Mor et al., 2011). The same is true for other factors, such as the E3 ubiquitin-protein ligase seven in absentia homolog 2 (SIAH2) (Mor et al., 2011), which mediates TNF- α -induced ubiquitination and degradation of TRAF2 (Habelhah et al., 2002).

To summarize, in this study we investigated miRNA expression of the most up- or downregulated miRNAs of active human MS lesions in two inflammatory animal models, the MOG_{35–55} peptide-induced EAE in C57/BL6 mice and the MOG_{1–125}-induced EAE in the common marmoset monkey. We show that the conserved and most upregulated miRNAs of active human MS lesions, miRNA-155, miRNA-142-3p, miRNA-146a/b and miRNA-21, are also upregulated in active

lesions in the preclinical models. This underlines that basic immune mechanisms modulated by miRNAs in active human MS lesions are comparable to the ones in these two inflammatory disease models.

Acknowledgments

We are grateful to Nancy Meyer for useful discussions and help with the scoring of EAE mice. The authors thank Christine Crozier for critical reading of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.jneuroim.2012.02.012](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.02.012).

References

- Aronica, E., Fluiter, K., Iyer, A., et al., 2010. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 31, 1100–1107.
- Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., Bartel, D.P., 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64–71.
- Benveniste, E.N., 1997. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J. Mol. Med. (Berl.)* 75, 165–173.
- Breijl, E.C., Brink, B.P., Veerhuis, R., et al., 2008. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 63, 16–25.
- Cardoso, A.L., Guedes, J.R., de Almeida, L.P., Pedrosa de Lima, M.C., 2011. miR-155 modulates microglia-mediated immune response by downregulating SOCS-1 and promoting cytokine and NO production. *Immunology* 10–2567.
- Coolen, M., Bally-Cuif, L., 2009. MicroRNAs in brain development and physiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 461–470.
- Cox, M.B., Cairns, M.J., Gandhi, K.S., et al., 2010. MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood. *PLoS One* 5, e12132.
- Cui, J.G., Li, Y.Y., Zhao, Y., Bhattacharjee, S., Lukiw, W.J., 2010. Differential regulation of interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) and IRAK-2 by microRNA-146a and NF-kappaB in stressed human astroglial cells and in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 285, 38951–38960.
- Czech, M.P., 2006. MicroRNAs as therapeutic targets. *N. Engl. J. Med.* 354, 1194–1195.
- De Santis, G., Ferracin, M., Biondani, A., et al., 2010. Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 226, 165–171.
- Diem, R., Demmer, I., Boretius, S., et al., 2008. Autoimmune optic neuritis in the common marmoset monkey: comparison of visual evoked potentials with MRI and histopathology. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3707–3714.
- Du, C., Liu, C., Kang, J., et al., 2009. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* 10, 1252–1259.
- Eisele, S., Krumbholz, M., Fischer, M.T., et al., 2012. Prospects of transcript profiling for mRNAs and microRNAs using formalin-fixed and paraffin-embedded dissected autoptic multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol.* Epub ahead of print, 10–3639.
- Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., et al., 2008. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452, 896–899.
- Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E., 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28, 138–145.
- Fenoglio, C., Cantoni, C., De, R.M., et al., 2011. Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 504, 9–12.
- Guerau-de-Arellano, M., Smith, K.M., Godlewski, J., et al., 2011. Micro-RNA dysregulation in multiple sclerosis favours pro-inflammatory T-cell-mediated autoimmunity. *Brain.* 134, 3578–3589.
- Habelhah, H., Frew, I.J., Laine, A., et al., 2002. Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2. *EMBO J.* 21, 5756–5765.
- Hu, W., Lucchinetti, C.F., 2009. The pathological spectrum of CNS inflammatory demyelinating diseases. *Semin. Immunopathol.* 31, 439–453.
- Junker, A., 2011. Pathophysiology of translational regulation by microRNAs in multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 585, 3738–3746.
- Junker, A., Krumbholz, M., Eisele, S., et al., 2009. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain* 132, 3342–3352.
- Junker, A., Hohlfeld, R., Meinl, E., 2011. The emerging role of microRNAs in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 56–59.
- Keller, A., Leidinger, P., Lange, J., et al., 2009. Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS One* 4, e7440.
- Kosik, K.S., 2006. The neuronal microRNA system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 911–920.
- Krishnamoorthy, G., Wekerle, H., 2009. EAE: an immunologist's magic eye. *Eur. J. Immunol.* 39, 2031–2035.
- Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., et al., 2005. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438, 685–689.

- Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., Bruck, W., 2002. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202–2212.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P., 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858–862.
- Lee, R.C., Ambros, V., 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862–864.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.
- Lindberg, R.L., Hoffmann, F., Mehling, M., Kühle, J., Kappos, L., 2010. Altered expression of miR-17-5p in CD4⁺ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur. J. Immunol.* 40, 888–898.
- Liston, A., Lu, L.F., O'Carroll, D., Tarakhovskiy, A., Rudensky, A.Y., 2008. Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *J. Exp. Med.* 205, 1993–2004.
- Lodish, H.F., Zhou, B., Liu, G., Chen, C.Z., 2008. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 120–130.
- Lu, L.F., Boldin, M.P., Chaudhry, A., et al., 2010. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 142, 914–929.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 1999. A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain* 122, 2279–2295.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 47, 707–717.
- Lukiw, W.J., Zhao, Y., Cui, J.G., 2008. An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J. Biol. Chem.* 283, 31315–31322.
- Martinelli-Boneschi, F., Fenoglio, C., Brambilla, P., et al., 2012. MicroRNA and mRNA expression profile screening in multiple sclerosis patients to unravel novel pathogenic steps and identify potential biomarkers. *Neurosci. Lett.* 508, 4–8.
- Merkler, D., Boscke, R., Schmelting, B., et al., 2006a. Differential macrophage/microglia activation in neocortical EAE lesions in the marmoset monkey. *Brain Pathol.* 16, 117–123.
- Merkler, D., Schmelting, B., Czeh, B., Fuchs, E., Stadelmann, C., Bruck, W., 2006b. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset reflects the immunopathology of pattern II multiple sclerosis lesions. *Mult. Scler.* 12, 369–374.
- Monticelli, S., Ansel, K.M., Xiao, C., et al., 2005. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol.* 6, R71.
- Mor, E., Cabilly, Y., Goldshmit, Y., et al., 2011. Species-specific microRNA roles elucidated following astrocyte activation. *Nucleic Acids Res.* 39, 3710–3723.
- Murugaiyan, G., Beynon, V., Mittal, A., Joller, N., Weiner, H.L., 2011. Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 187, 2213–2221.
- Ng, E.K., Chong, W.W., Jin, H., et al., 2009. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 58, 1375–1381.
- Noorbakhsh, F., Ellestad, K.K., Maingat, F., et al., 2011. Impaired neurosteroid synthesis in multiple sclerosis. *Brain* 134, 2703–2721.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343, 938–952.
- O'Connell, R.M., Taganov, K.D., Boldin, M.P., Cheng, G., Baltimore, D., 2007. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1604–1609.
- O'Connell, R.M., Kahn, D., Gibson, W.S., et al., 2010a. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* 33, 607–619.
- O'Connell, R.M., Rao, D.S., Chaudhuri, A.A., Baltimore, D., 2010b. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 111–122.
- Otaegui, D., Baranzini, S.E., Armananzas, R., et al., 2009. Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS One* 4, e6309.
- Platten, M., Steinman, L., 2005. Multiple sclerosis: trapped in deadly glue. *Nat. Med.* 11, 252–253.
- Ponomarev, E.D., Veremeyko, T., Barteneva, N., Krichevsky, A.M., Weiner, H.L., 2011. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-alpha-PU.1 pathway. *Nat. Med.* 17, 64–70.
- Rusca, N., Monticelli, S., 2011. MiR-146a in immunity and disease. *Mol. Biol. Int.* 437301 Epub; 2011 Apr 7, 437301.
- Saxena, A., Martin-Blondel, G., Mars, L.T., Liblau, R.S., 2011. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 585, 3758–3763.
- Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., Rajewsky, N., 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58–63.
- Sriram, S., Rodriguez, M., 1997. Indictment of the microglia as the villain in multiple sclerosis. *Neurology* 48, 464–470.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J., Baltimore, D., 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12481–12486.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Baltimore, D., 2007. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity* 26, 133–137.
- Thamilarasan, M., Koczan, D., Hecker, M., Paap, B., Zettl, U.K., 2012. MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmun. Rev.* 11, 174–179.
- Tili, E., Michaille, J.J., Cimino, A., et al., 2007. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J. Immunol.* 179, 5082–5089.
- Waschbisch, A., Atiya, M., Linker, R.A., Potapov, S., Schwab, S., Derfuss, T., 2011. Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression in relapsing remitting multiple sclerosis. *PLoS One* 6, e24604.
- Wust, S., van den Brandt, J., Tischner, D., et al., 2008. Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 180, 8434–8443.
- Zhou, X., Jeker, L.T., Fife, B.T., et al., 2008. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J. Exp. Med.* 205, 1983–1991.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Wolfgang Brück für die Möglichkeit der Dissertation im Institut für Neuropathologie und die Überlassung des Themas danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Junker für die ausgezeichnete, engagierte Betreuung und fachliche Unterstützung in allen Phasen des Projektes.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei den Mitarbeiterinnen des Institutes für Neuropathologie für die freundliche Zusammenarbeit und Hilfestellungen während der Durchführung meiner Versuche, insbesondere bei Uta Scheidt, Franziska Paap und Verena Schultz.

Außerdem danke ich allen Mitwirkenden bei der Veröffentlichung des Projektes, vor allem Frau Prof. Jutta Gärtner für die Unterstützung bei der LDA-Untersuchung und Herrn Prof. Eberhard Fuchs für die Unterstützung bezüglich des Arbeitsteils mit den Weißbüschelaffen.