

Aus der Klinik für Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Mikro-RNA-Expression bei der Einschlusskörpermyositis

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Anna Katharina Franziska Beatrice Göttsche

aus

Hamburg

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. med. J. Schmidt

Ko-Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. A. Fischer

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. med. J. Schmidt

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. A. Fischer

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 26.09.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Mikro-RNA-Expression bei der Einschlusskörpermyositis" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Einschlusskörpermyositis.....	1
1.1.1 Klinik, Diagnose und Therapie der IBM.....	1
1.1.2 Pathogenese der IBM.....	2
1.1.2.1 Entzündliche Merkmale der IBM.....	2
1.1.2.2 Degenerative Merkmale der IBM.....	3
1.1.2.3 Zellstress bei der IBM.....	3
1.1.3 Zellkulturmodell der IBM.....	4
1.2 Mikro-RNA.....	4
1.2.1 Nomenklatur von mikro-RNA.....	4
1.2.2 Biogenese und Funktion von mikro-RNA.....	5
1.2.3 Mikro-RNA bei Krankheiten.....	6
1.2.4 Mikro-RNA im Muskel und bei der IBM.....	6
1.2.5 Mikro-RNA-146a und mikro-RNA-133.....	7
1.3 Ziel der Arbeit.....	8
2 Material und Methoden.....	9
2.1 Muskelbiopsien.....	10
2.2 Blutproben.....	12
2.3 Zellkulturversuche.....	13
2.3.1 Kultivierung humaner Myoblasten und Myotuben.....	13
2.3.2 Exposition zu proinflammatorischen Zytokinen.....	14
2.3.3 Transfektion von Plasmiden durch Lipofectamine.....	14
2.3.4 Transfektion von mikro-RNA durch Lipid-Nanopartikel.....	15
2.3.5 MHC-I-Immunfluoreszenzfärbung.....	15
2.4 RNA-Extraktion.....	16
2.5 Sequenzierung.....	17
2.6 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	17
2.7 Software.....	18
3 Ergebnisse.....	19
3.1 Sequenzierung vom In-vitro-Modell der IBM.....	19
3.2 Sequenzierung von Muskelbiopsien.....	22
3.3 Sequenzierung von Blutproben.....	26

3.4 Transfektionen im Zellkulturmodell mit Plasmiden.....	30
3.4.1 Überprüfung der Transfektion und der Mikro-RNA-Expression.....	30
3.4.2 Kontrolle der Exposition zu proinflammatorischen Zytokinen.....	32
3.4.3 Analyse von Zellstressmarkern.....	34
3.5 Transfektionen im Zellkulturmodell durch Lipid-Nanopartikel.....	35
3.5.1 Überprüfung der Transfektion und der Mikro-RNA-Expression.....	35
3.5.2 Kontrolle der Exposition zu proinflammatorischen Zytokinen.....	37
3.5.3 Analyse von Zellstressmarkern.....	38
3.5.4 Transfektion durch Lipid-Nanopartikel in CCL-136 Zellen.....	40
4 Diskussion.....	42
4.1 Sequenzierungen vom In-vitro-Modell und von den Muskelbiopsien.....	42
4.1.1 Vergleich der Ergebnisse der Sequenzierungen.....	42
4.1.2 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien.....	42
4.1.3 Ausgewählte Mikro-RNA-Veränderungen.....	44
4.1.3.1 Mikro-RNA-1 und -133.....	44
4.1.3.2 Mikro-RNA-146.....	45
4.1.3.3 Mikro-RNA-155.....	45
4.1.4 Ausblick zu den Muskelproben.....	46
4.2 Sequenzierung der Blutproben.....	47
4.2.1 Ergebnisse der Sequenzierung der Blutproben.....	47
4.2.2 Vergleich der Ergebnisse der Blutproben mit anderen Studien.....	48
4.2.3 Ausblick zu den Blutproben.....	49
4.3 Transfektionsexperimente.....	50
4.3.1 Ergebnisse der Transfektionsexperimente.....	50
4.3.2 Methodik der Transfektionsexperimente.....	51
4.3.3 Ausblick zu den Transfektionsexperimenten.....	52
4.4 Mikro-RNA-Expressionsmuster bei der Einschlusskörpermyositis.....	53
5 Zusammenfassung.....	54
6 Literaturverzeichnis.....	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MHC-I-Färbung zur Kontrolle der Zytokinexposition.....	20
Abbildung 2: Differentiell exprimierte mikro-RNAs im Zellkulturmodell.....	21
Abbildung 3: PCA-Plot der Muskelbiopsien.....	23
Abbildung 4: Differentiell exprimierte mikro-RNAs der Muskelbiopsien.....	24
Abbildung 5: Korrelation gemeinsam differentiell exprimierter mikro-RNAs von In-vitro-Modell und Biopsien.....	26
Abbildung 6: PCA-Plot der Blutproben.....	27
Abbildung 7: Differentiell exprimierte mikro-RNAs der Blutproben.....	28
Abbildung 8: Mikro-RNA-PCR der Plasmid-Transfektionsexperimente.....	31
Abbildung 9: MHC-I-Färbung der Plasmid-Transfektionsexperimente.....	32
Abbildung 10: Graustufenanalyse der MHC-I-Immunfluoreszenzfärbung der Plasmid-Transfektionsexperimente.....	33
Abbildung 11: PCR der Zellstressmarker bei Plasmid-Transfektionsexperimenten.....	34
Abbildung 12: Mikro-RNA-PCR der Lipid-Nanopartikel-Transfektionsexperimente..	36
Abbildung 13: MHC-I-Färbung der Lipid-Nanopartikel-Transfektionsexperimente...	37
Abbildung 14: Graustufenanalyse der MHC-I-Immunfluoreszenzfärbung der Lipid-Nanopartikel-Transfektionsexperimente.....	38
Abbildung 15: Ergebnisse der MHC-I- und CXCL9-PCRs der Lipid-Nanopartikel-Transfektionsexperimente.....	39
Abbildung 16: Mikro-RNA-PCR der CCL-136 Zellen.....	40
Abbildung 17: MHC-I-Färbung von CCL-136 Zellen.....	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien, Geräte und Kits.....	9
Tabelle 2: Übersicht Muskelbiopsien.....	11
Tabelle 3: Übersicht der analysierten Blutproben.....	12
Tabelle 4: Plasmide für die Transfektionsversuche.....	15
Tabelle 5: Oligonukleotide für die Transfektionsversuche.....	15
Tabelle 6: TaqMan PCR-Primer/TaqMan Advanced miRNA Assays der Firma Thermo Fisher Scientific.....	18
Tabelle 7: Primärzellkulturen der sequenzierten Proben.....	19
Tabelle 8: Differentiell exprimierte mikro-RNAs im In-vitro-Modell.....	22
Tabelle 9: Differentiell exprimierte mikro-RNAs der Muskelbiopsien.....	25
Tabelle 10: Vergleich der differentiell exprimierten mikro-RNAs des In-vitro-Modells und der Muskelbiopsien.....	25
Tabelle 11: Differentiell exprimierte mikro-RNAs der Blutproben.....	29
Tabelle 12: Vergleich der differentiell exprimierten mikro-RNAs von Blutproben und Muskelbiopsien oder In-vitro-Modell.....	29

Abkürzungsverzeichnis

BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CXCL9	C-X-C Motif Chemokin Ligand 9
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
IBM	Einschlusskörpermyositis
IFN γ + IL-1 β	Exposition zu Interferon γ und Interleukin-1 β
IM	inflammatorische Myopathien
IL	Interleukin
INF	Interferon
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex 1
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure

1 Einleitung

1.1 Einschlusskörpermyositis

Die Einschlusskörpermyositis (*inclusion body myositis*, IBM) zählt zu der Gruppe der inflammatorischen Myopathien (IM). Dazu gehören außerdem die Dermatomyositis, die nekrotisierende Myopathie und die *Overlap*-Myositis, unter der auch das Antisynthetase-Syndrom eingeordnet wird. Die bisher ebenfalls hinzuzählende Diagnose Polymyositis ist aktuell umstritten (Ashton et al. 2021).

In dieser Arbeit wird ausschließlich die sporadische Form der IBM untersucht. Daneben existieren hereditäre Einschlusskörpermyopathien, die jedoch eine eigene Krankheitsentität darstellen (Schmidt und Dalakas 2013) und hier nicht betrachtet werden sollen.

1.1.1 Klinik, Diagnose und Therapie der IBM

Die Prävalenz der IBM liegt etwa zwischen 5 und 30 pro eine Million Einwohner*innen (Badrising et al. 2000; Schmidt und Schmidt 2017). Sie betrifft vor allem Patient*innen nach dem 50. Lebensjahr, daher steigt die Prävalenz in dieser Altersgruppe auf etwa 50 pro eine Million. Die IBM ist dort die häufigste inflammatorische Myopathie (Ashton et al. 2021). Allerdings gilt die IBM weiterhin als unterdiagnostiziert, auch finden sich häufig Fehldiagnosen, sodass verlässliche Angaben zur Epidemiologie bislang fehlen. Männer erkranken etwa doppelt so häufig wie Frauen (Schmidt und Schmidt 2017).

Hauptsymptom der IBM als chronische Erkrankung ist eine langsam progressive Schwäche und Atrophie der Muskulatur. Initial am stärksten betroffen ist gewöhnlich die distale Muskulatur, insbesondere die langen Fingerbeuger und Kniestrecker. Möglich ist auch eine Schwäche der Gesichtsmuskulatur, der Kopfhaltmuskulatur oder der Atemmuskulatur. Als weiteres wichtiges Symptom tritt bei bis zu 70 % der Patient*innen eine Dysphagie hinzu. Viele weitere Muskeln können im Verlauf betroffen sein. Entsprechend erleben die Patient*innen unterschiedliche Einschränkungen im alltäglichen Leben, von häufigen Stürzen, Gehbehinderungen und Schluckstörungen bis zu Einschränkungen der Feinmotorik. Die Lebensqualität nimmt über die Jahre deutlich ab, auch wenn die Lebenserwartung nicht oder nur gering begrenzt ist (Cox et al. 2011; Dalakas 2015; Schmidt und Schmidt 2017; Ashton et al. 2021).

Die Diagnose kann anhand der *ENMC IBM research diagnostic criteria 2011* gestellt werden. Dabei wird nach klinischen, laborchemischen und pathologischen Kriterien zwischen wahrscheinlicher, klinisch definierter und klinisch-pathologisch definierter IBM unterteilt (Rose 2013). Neben der Histopathologie der weiterhin unentbehrlichen Muskelbiopsie wird so das klinische Bild der Patient*innen stärker berücksichtigt, um eine frühe Diagnose zu ermöglichen. Häufig zeigt sich die Ausprägung mehrerer pathologischer Kriterien erst im Verlauf der Erkrankung (Schmidt und Dalakas 2013).

Unterschiedliche therapeutische Ansätze hatten bisher nicht den gewünschten Erfolg. Weder Immunsuppressiva wie beispielsweise Glukokortikoide, Azathioprin oder Methotrexat, noch neuere Medikamente wie der IL-1 β -Antagonist Anakinra oder Antikörpertherapien verbesserten langfristig den Krankheitsverlauf. Auch intravenöses Immunglobulin konnte in Studien nicht überzeugen, obwohl es kurzfristig bei manchen Patient*innen Symptome, vor allem die Dysphagie, abschwächen kann. Weitere neue Therapeutika werden aktuell in Studien geprüft. Bislang bleiben symptomatische Therapien am wichtigsten für die Patient*innenversorgung. Physiotherapie, Ergotherapie, Hilfsmittelversorgung oder invasive Therapien bei resistenter Dysphagie können Symptome lindern (Schmidt und Dalakas 2013; Dalakas 2015; Schmidt 2018; Ashton et al. 2021).

1.1.2 Pathogenese der IBM

Die Pathogenese der IBM ist trotz vieler bekannter Merkmale bislang nicht aufgeklärt. Man findet auf Zellebene sowohl Zeichen von autoimmuner Entzündung als auch degenerativ bedingte myopathische Veränderungen. Die Inflammation und die Degeneration scheinen eng verknüpft, die molekularen Mechanismen des Zusammenspiels und der Ursprung der Krankheit sind jedoch ungewiss (Askanas et al. 2012; Benveniste et al. 2015).

1.1.2.1 Entzündliche Merkmale der IBM

In den Muskelbiopsien von IBM-Patient*innen ist ein entzündliches Infiltrat im Endomysium eines der klassischen Kennzeichen (Rose 2013; Schmidt 2018). Insbesondere autoaggressive, hochdifferenzierte, zytotoxische T-Zellen sind beteiligt, die in die Muskelzellen eindringen und sie zerstören. Eine klonale Expansion der T-Zellen in Muskeln und Blut konnte nachgewiesen werden. Bisher wurde allerdings das entsprechende Muskel(auto-)antigen nicht identifiziert (Dimitri et al. 2006; Greenberg et al. 2019; Greenberg 2020). Daneben besteht im Muskelgewebe der IBM lokal ein proinflammatorisches Milieu, gekennzeichnet unter anderem durch zahlreiche Zytokine und Chemokine wie beispielsweise TNF α , IL-1 β und INF γ (De

Paepe et al. 2009). Die Muskelzellen exprimieren wiederum vermehrt Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC-I) und einige zusätzlich MHC-II (Figarella-Branger et al. 2003; Uruha et al. 2021), sowie kostimulatorische Moleküle (Wiendl et al. 2003). So gehören sie zu den fakultativ antigenpräsentierende Zellen (Goebels et al. 1992).

Zusätzlich ist unter IBM Patient*innen auf genetischer Ebene eine Häufung einiger HLA (Histokompatibilitätsantigen)-Allele zu beobachten, die mit Autoimmunerkrankungen assoziiert sind (Badrising et al. 2004; Schmidt und Dalakas 2013). Darüber hinaus weisen viele IBM-Patient*innen einen gegen die zytosolische 5'-Nukleotidase 1A gerichteten Autoantikörper auf. Dieser ist bei IBM wesentlich häufiger als in den anderen IM zu finden (Pluk et al. 2013; Schmidt und Dalakas 2013).

1.1.2.2 Degenerative Merkmale der IBM

Neben den entzündlichen Merkmalen sind die Muskelbiopsien von IBM-Patient*innen durch degenerative Prozesse charakterisiert. Die makroskopische Muskelatrophie wird von einer mikroskopischen Atrophie der Muskelfasern begleitet (Benveniste et al. 2015). Intrazellulär lassen sich Vakuolisierung und Proteinakkumulation beobachten (Askanas et al. 2012). Die Proteinaggregate bestehen aus verschiedenen Proteinen, unter anderem konnten β -Amyloid, phosphoryliertes Tau, α -Synuclein und Ubiquitin nachgewiesen werden (Askanas und Engel 2011). Damit bestehen Parallelen zu einigen neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson. Diese Erkrankungen werden, wie auch die IBM, zusätzlich in Verbindung mit dem Alterungsprozess gebracht (Askanas und Engel 2008).

1.1.2.3 Zellstress bei der IBM

Degeneration und Inflammation führen zu intrazellulärem Zellstress, welcher wiederum fördernd auf erstgenannte Prozesse wirkt (Schmidt und Dalakas 2013). Belegt wurde zum Beispiel die verstärkte Expression der induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) mit konsekutiver vermehrter intrazellulärer Stickstoffmonoxid-Produktion (Schmidt et al. 2012). Auch α B-Crystallin als weiterer Zellstressmarker ist erhöht (Muth et al. 2009). Zusätzlich findet man Hinweise auf Stress des endoplasmatischen Retikulums (Vattemi et al. 2004). Nicht zuletzt zeigt sich eine Dysfunktion der Mitochondrien (Rygiel et al. 2015) und des Autophagiesystems. Makroautophagie wird zwar verstärkt aktiviert, ist jedoch auch funktionell gestört (Nogalska et al. 2010).

1.1.3 Zellkulturmodell der IBM

Zusammenfassend sind die beiden Hauptmerkmale der IBM, Entzündung und Degeneration der Muskulatur, unter anderem durch den Zellstress miteinander assoziiert. Trotz vieler bekannter einzelner Mechanismen bleiben die Pathogenese und der initiale Auslöser der IBM unbekannt und Gegenstand weiterer Forschung.

In dieser Arbeit wurde ein etabliertes Zellkulturmodell basierend auf humanen Myotuben verwendet. Dafür werden die Muskelzellen den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und INF γ exponiert (Schmidt et al. 2008), worauf die Muskelzellen unter anderem mit der bereits beschriebenen verstärkten Expression von MHC-I und iNOS reagieren. Weitere ebenfalls erhöhte Zellstressmarker sind in diesem Zusammenhang High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) (Muth et al. 2015) und C-X-C Motif Chemokin Ligand 9 (CXCL9) (De Paepe et al. 2009).

1.2 Mikro-RNA

Mikro-RNAs sind eine Klasse kleiner, nicht-kodierender Ribonukleinsäure (RNA)-Moleküle, deren Hauptaufgabe in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression besteht. Seit ihrer Entdeckung Ende der 1990er Jahre wurde ihr Vorkommen und ihre Funktion in Pflanzen und Tieren untersucht. Bisher sind weit über 2000 humane mikro-RNAs bekannt. Sie sind häufig evolutionär konserviert und in der Regel etwa 22 Nukleotide lang. Durch RNA-Interferenz bewirken sie hauptsächlich eine Hemmung der Translation ihrer Ziel-*messenger* RNAs (mRNA). Damit regulieren sie geschätzt etwa ein Drittel der Genexpression beim Menschen und können etwa 60 % der proteinkodierenden Gene beeinflussen. Häufig werden sie gewebespezifisch und abhängig vom Entwicklungs- und Differenzierungsstadium exprimiert (Bartel 2004; Catalanotto et al. 2016; Saliminejad et al. 2019).

1.2.1 Nomenklatur von mikro-RNA

Seit der Entdeckung von mikro-RNAs hat sich die Forschung in diesem Feld rasant entwickelt. Dabei stellt sich immer wieder die Frage, wie eine mikro-RNA definiert und von anderen kleinen RNA-Klassen unterschieden werden soll. Auch die Namensgebung der mikro-RNAs und ihrer Gene muss den neuen Erkenntnissen angepasst werden. Mittlerweile wurden von einigen mikro-RNAs Isoformen entdeckt, daneben gibt es identische reife mikro-RNAs von mehreren Genen. Auch in Mitochondrien wurden mikro-RNAs gefunden, die möglicherweise in der mitochondrialen DNA kodiert sind. Zudem sind häufig identische oder

sehr ähnliche mikro-RNAs in unterschiedlichen Spezies vorhanden, die nicht immer gleich benannt wurden. So finden sich in den gängigen Datenbanken wahrscheinlich viele fehlerhafte oder ungenaue Einträge. Ein einheitliches Klassifizierungssystem und eine einheitliche Nomenklatur wird für die weitere Forschung benötigt, teils wurden bereits Kriterien dafür vorgeschlagen (Ambros et al. 2003; Fromm et al. 2015; Budak et al. 2016). Ebenso finden sich bislang diverse Schreibweisen für mikro-RNA, beispielsweise *microRNA*, *miRNA* oder *miR*.

In dieser Arbeit werden synonym die beiden folgenden Schreibweisen verwendet: hsa-miR-181a-2-3p und mikro-RNA-181a-2-3p. Die Abkürzung hsa beschreibt humane (Homo sapiens) mikro-RNAs. Eng verwandte mikro-RNAs werden als Familie zusammengefasst und erhalten zusätzlich zu ihrer Nummer einen Buchstaben (zum Beispiel „a“) zur Identifizierung. Manchmal können aus verschiedenen Genen identische reife mikro-RNAs entstehen, dann werden diese zusätzlich durchnummeriert (hier zum Beispiel „2“), sonst wird auf diesen Teil verzichtet. Die Endung 3p oder 5p kennzeichnet die zwei Einzelstränge der zunächst doppelsträngigen mikro-RNA; fehlt diese Angabe, ist die biologisch aktive mikro-RNA gemeint.

1.2.2 Biogenese und Funktion von mikro-RNA

Mikro-RNA-Gene finden sich in unterschiedlichen Bereichen des menschlichen Genoms. Durch Transkription entstehen zunächst *primary* (pri-) mikro-RNAs. Diese werden durch die RNase Drosha zu *precursor* (pre-) mikro-RNAs prozessiert und nehmen eine charakteristische Haarnadelstruktur an. Anschließend werden diese Vorläufer aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert, wo sie von einer weiteren RNase, Dicer, in die reife doppelsträngige mikro-RNA geschnitten werden. Neben diesem klassischen Weg können mikro-RNAs auch über andere Wege entstehen (Saliminejad et al. 2019).

Die reife mikro-RNA wird mithilfe anderer Proteine auf ein Argonautenprotein geladen. Dieses Argonautenprotein vermittelt unter anderem die Aufspaltung der mikro-RNA in biologisch aktive Einzelstränge und bildet gemeinsam mit dem Mikro-RNA-Einzelstrang sowie anderen Proteinen den *RNA-induced silencing complex* (RISC). Mithilfe des RISC können Ziel-mRNAs über Basenpaarungen spezifisch erkannt werden (Bartel 2004; Catalanotto et al. 2016).

Die Translation der Ziel-mRNAs wird daraufhin inhibiert. Die mRNA kann gespalten werden, häufig wird sie jedoch durch unterschiedliche Mechanismen nur destabilisiert oder lediglich die Translation in Proteine unterbunden. Dabei kann eine mikro-RNA viele verschiedene Ziel-mRNAs haben und in unterschiedlichen Systemen auch gegensätzliche Wirkungen entfalten. Ferner kann eine mRNA Ziel unterschiedlicher mikro-RNAs sein, sodass bei Zusammen-

wirken dieser mikro-RNAs gegebenenfalls eine stärkere Unterdrückung der Genexpression auftritt (Mott und Mohr 2015; Catalanotto et al. 2016). Häufig haben mikro-RNAs jedoch einen milden Effekt und schalten die Expression nicht vollständig ab, sondern bewirken vielmehr eine Feinabstimmung der Genexpression und Aufrechterhaltung der Homöostase (Fischer 2015; Saliminejad et al. 2019).

Möglicherweise sind mikro-RNAs zusätzlich an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt. Über *gap junctions* können sie die Genexpression der Nachbarzellen beeinflussen (Lemcke et al. 2015). Außerdem können mikro-RNAs nicht nur intrazellulär, sondern auch extrazellulär gefunden werden, beispielsweise in Blut, Serum und anderen Körperflüssigkeiten (Mott und Mohr 2015). Durch Transport in Exosomen, Lipoproteinen oder anderen Partikeln können sie in den entsprechenden Zielzellen ihre Wirkung entfalten. Die Relevanz dieser Mechanismen muss allerdings weiter erforscht werden (Zheng et al. 2017; Saliminejad et al. 2019).

1.2.3 Mikro-RNA bei Krankheiten

Als wichtige Regulatoren der Genexpression sind mikro-RNAs bei vielen bereits bekannten Zellfunktionen und Signalwegen bedeutend. Veränderungen der Mikro-RNA-Expression lassen sich nicht nur bei physiologischen Prozessen nachweisen, sondern auch bei der Reaktion von Zellen auf verschiedene Stressstimuli (Spriggs et al. 2010) sowie bei diversen Krankheiten (Paul et al. 2018). So spielen mikro-RNAs zum Beispiel eine Rolle bei Diabetes, Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen (Paul et al. 2018; Saliminejad et al. 2019).

Mikro-RNAs sind Kandidaten als Biomarker für die Diagnostik und den Verlauf von Krankheiten, da sie im Blut nachweisbar und stabil sind (Gilad et al. 2008; Navickas et al. 2016). Zusätzlich bieten sie einen neuen Angriffspunkt für Therapien. Synthetische mikro-RNAs könnten als Medikamente wirken, genauso könnte eine Inhibition der zelleigenen mikro-RNA eine wirksame Therapie sein. Die Ergebnisse der Forschung zur medizinischen Anwendung bleiben aktuell abzuwarten (Saliminejad et al. 2019).

1.2.4 Mikro-RNA im Muskel und bei der IBM

Einige mikro-RNAs werden, wie oben beschrieben, gewebespezifisch exprimiert. Die spezifisch im quergestreiften Muskel exprimierten mikro-RNAs werden *myomiRs* genannt. Dazu gehören nach aktuellem Kenntnisstand mikro-RNA-1, -133a, -133b, -206, -208a, -208b, -486 und -499. Sie werden in Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert, außer mikro-RNA-206, die als skelettmuskelspezifisch gilt, und mikro-RNA-208a, die als herzmuskelspezifisch gilt (Horak et al. 2016). Die *myomiRs* sind wichtig für Muskelproliferation, -differenzierung und

-regeneration (Chen et al. 2006; Horak et al. 2016). Daneben sind zusätzlich andere mikro-RNAs bedeutend für die Aufrechterhaltung der Muskelfunktion. Zum Beispiel beeinflusst mikro-RNA-155 bei der Muskelregeneration die Immunantwort und sorgt für eine Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Makrophagen (Nie et al. 2016).

Bei vielen Muskelerkrankungen einschließlich der inflammatorischen Myopathien findet man eine veränderte Mikro-RNA-Expression im Muskel (Eisenberg et al. 2007). Zudem wurde in Bezug auf die IM gezeigt, dass $\text{TNF}\alpha$ durch eine Hemmung der Expression von mikro-RNA-1, -133a und -133b die Differenzierung von Muskelzellen inhibiert (Georgantas et al. 2014). Zusätzlich wurden in Blutproben von Patient*innen mit Dermatomyositis oder Polymyositis Unterschiede bei der Mikro-RNA-Expression nach einer Therapie festgestellt (Hirai et al. 2018). Es ist also davon auszugehen, dass sich auch bei der Einschlusskörpermyositis die Mikro-RNA-Expression verändert. Diese Veränderungen und ihre Bedeutung für die Krankheit sind bisher nicht ausreichend charakterisiert.

1.2.5 Mikro-RNA-146a und mikro-RNA-133

Da in dieser Arbeit Transfektionsexperimente mit mikro-RNA-146a und mikro-RNA-133 durchgeführt wurden, findet sich im Folgenden eine kurze Zusammenfassung über bekannte Funktionen dieser speziellen mikro-RNAs.

Mikro-RNA-133 wird auf drei Genen im menschlichen Genom kodiert, und in zwei eng verwandten Formen exprimiert (mikro-RNA-133a und b). Beide gehören wie im vorherigen Absatz dargestellt zu den muskelspezifischen mikro-RNAs. Unter anderem sind sie wichtig für die Differenzierung von Muskelzellen und werden dabei verstärkt exprimiert. Dies gilt ebenso für die Muskelregeneration (Horak et al. 2016). Mikro-RNA-133 wird im Skelett- und Herzmuskel exprimiert. So ist sie bei vielen diesbezüglichen Krankheiten auffällig, beispielsweise bei Muskeldystrophie, Herzhypertrophie oder Herzinsuffizienz. Auch als Biomarker bei kardiovaskulären Krankheiten sowie als möglicher Tumorsuppressor und Biomarker verschiedener Krebserkrankungen wird mikro-RNA-133 diskutiert (Horak et al. 2016; Navickas et al. 2016; Hua et al. 2021).

Mikro-RNA-146a dient in erster Linie als negativer Regulator des angeborenen Immunsystems, ist also mit entzündlichen und (auto-)immunen Prozessen assoziiert. Sie kann unter anderem durch Zytokine wie $\text{IL-1}\beta$ induziert werden, und bewirkt unter anderem eine Abnahme verschiedener Entzündungsmediatoren. Zusätzlich scheint mikro-RNA-146a im erworbenen Immunsystem ebenfalls wichtig zu sein. Auch für die Hämatopoese ist mikro-RNA-146a von Bedeutung. Außer bei Autoimmunkrankheiten und Infektionen finden sich

Veränderungen dieser mikro-RNA ebenfalls bei neurodegenerativen Erkrankungen und einer Reihe von Krebserkrankungen. Bei letzteren wirkt mikro-RNA-146a auf einige Neoplasien tumorsuppressiv, auf andere eher tumorfördernd (Labbaye und Testa 2012; Comer et al. 2014; Saba et al. 2014; Iacona und Lutz 2019).

1.3 Ziel der Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist, die Mikro-RNA-Expression bei der Einschlusskörpermyositis zu charakterisieren und den Einfluss von mikro-RNA auf das Krankheitsgeschehen, insbesondere die Pathogenese, zu untersuchen.

Bislang wurden mikro-RNAs bei den inflammatorischen Myopathien, insbesondere bei der IBM, wenig erforscht (Eisenberg et al. 2007; Parkes et al. 2015; Parkes et al. 2020). Die bisher veröffentlichten Daten lassen jedoch vermuten, dass Untersuchungen von mikro-RNA sowohl für die Aufklärung der Pathogenese als auch für die Diagnostik und Therapie der IBM hilfreich sein können (Paulson 2006).

Diese Arbeit soll mithilfe unterschiedlicher Ansätze einen Beitrag dazu leisten. Einerseits wurde die mikro-RNA von unterschiedlichen Proben sequenziert, um Veränderungen im Expressionsmuster bei der IBM aufzudecken. Dabei wurde das auf humanen Myotuben basierende Zellkulturmodell der IBM mit Muskel- und Blutproben von IBM-Patient*innen verglichen. Andererseits wurden Transfektionsexperimente im Zellkulturmodell durchgeführt, um den Einfluss spezieller mikro-RNAs zu untersuchen. Dafür wurden zwei verschiedene Transfektionssysteme genutzt. Basierend auf den Ergebnissen der Sequenzierung und dem bisherigen Kenntnisstand über mikro-RNAs wurden für diese Experimente zunächst mikro-RNA-146a und mikro-RNA-133 ausgewählt.

2 Material und Methoden

Die in den unterschiedlichen Teilen der Arbeit verwendeten Methoden werden im Folgenden zusammengefasst. Eine Aufstellung der verwendeten Materialien, Geräte und Kits findet sich in Tabelle 1.

Für diese Arbeit wurden verschiedene Proben von Patient*innen gewonnen, dafür liegt ein positives Ethikvotum vor (AZ 5/2/16). Die Patient*innen wurden ausführlich aufgeklärt und willigten in die Gewinnung und Verwendung der Proben zu Forschungszwecken ein.

Bei Zellkulturversuchen wurde stets steril gearbeitet.

Tabelle 1: Verwendete Materialien, Geräte und Kits

Materialien	Firma
0,05 % Trypsin/EDTA	Gibco
Aceton	Carl Roth
BSA	Carl Roth
DAPI	Life Technologies
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific
Fluoromount-G	SouthernBiotech
Glyzerol	Carl Roth
Opti-MEM Reduced Serum Medium + GlutaMAX Supplement	Gibco
PBS	Th. Geyer
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Precellys-Keramik-Kügelchen	PeqLab
recombinant human IL-1 beta	InvivoGen
recombinant human INF gamma	InvivoGen
RNAse-freies Wasser	Gibco
Skeletal Muscle Cell Differentiation Medium + Supplement Mix	Promocell
Skeletal Muscle Cell Growth Medium + Supplement Mix	Promocell

Materialien	Firma
TaqMan Gene Expression MasterMix	Applied Biosystems
Tris-EDTA Buffer	Carl Roth
Trizol: QIAzol Lysis Reagent	Qiagen
Tween	Carl Roth
X-Vivo 15	Lonza
Zellkulturplatten	Th. Geyer
Ziegenserum	Sigma Aldrich
Geräte	Firma
2100 Bioanalyzer Instrument	Agilent
HiSeq 2000 Sequencing System	Illumina
Mikroskop: Axiovert 200M	Zeiss
Nano Drop One	Thermo Fisher Scientific
PAXgene Blood RNA Tube	PreAnalytix
Real-Time-PCR System QuantStudio 3	Thermo Fisher Scientific
The NanoAssemblr Spark	Precision NanoSystems
Kits	Firma
Lipofectamine 3000 Reagent Protocol	Invitrogen
NEBNext Small RNA library prep set for Illumina	New England BioLabs
Neuro9 siRNA Spark Transfection Kit	Precision NanoSystems
NucleoSpin miRNA Kit	Macherey-Nagel
PAXgene Blood miRNA Kit	PreAnalytix
RNA Clean and Concentrator-5 Kit	Zymo Research
SuperScript II cDNA Synthese Kit	Invitrogen
TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit	Applied Biosystems

2.1 Muskelbiopsien

Das verwendete Muskelgewebe stammt aus Biopsien, die im Rahmen der klinischen Routinediagnostik entnommen worden sind. Die Proben wurden im Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen für die Diagnosestellung nach histopathologischen

Kriterien aufgearbeitet. Das Restgewebe wurde bei -80 °C aufbewahrt und zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt. Für diese Arbeit wurden jeweils neun Proben von Patient*innen mit Einschlusskörpermyositis sowie alters- und geschlechtsangeglichene Kontrollproben von Patient*innen ohne Muskelpathologie ausgewählt; Angaben dazu finden sich in Tabelle 2. Aus diesen Muskelproben wurde für die Sequenzierung die RNA isoliert.

Tabelle 2: Übersicht Muskelbiopsien

Gruppe	Biopsie	Geschlecht	Alter (in Jahren)
Einschlusskörpermyositis	1	m	55
	2	m	59
	3	m	61
	4	w	81
	5	w	70
	6	w	69
	7	w	76
	8	w	77
	9	m	51
Kontrollen	1	m	53
	2	m	58
	3	m	60
	4	w	80
	5	w	70
	6	w	67
	7	w	76
	8	w	78
	9	m	51

m = männlich, w = weiblich

2.2 Blutproben

Es wurden Blutproben von Patient*innen mit unterschiedlichen Erkrankungen (Einschlusskörpermyositis, Dermatomyositis, Antisynthetase-Syndrom, Chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie und Myotone Dystrophie Typ 1) sowie von weder myopathisch noch inflammatorisch erkrankten Kontrollproband*innen gesammelt, um aus Vollblut RNA zu gewinnen. In dieser Arbeit wurden jeweils zehn Proben von Patient*innen mit Einschlusskörpermyositis und von Kontrollproband*innen durch RNA-Sequenzierung analysiert. Einen Überblick über diese Proben gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Übersicht der analysierten Blutproben

Gruppe	Blutprobe	Geschlecht	Alter (in Jahren)
Einschlusskörpermyositis	1	m	75
	2	w	64
	3	w	71
	4	w	76
	5	m	63
	6	m	66
	7	w	52
	8	m	77
	9	w	82
	10	m	52
Kontrollen	1	m	55
	2	m	29
	3	m	62
	4	w	51
	5	m	62
	6	m	86
	7	w	47
	8	w	25
	9	w	37
	10	w	56

m = männlich, w = weiblich

Den Proband*innen wurden nach Aufklärung und Einwilligung 2,5 ml venöses Blut in PAXgene Blood RNA Tubes entnommen. Entsprechend den Herstellerangaben wurden die Blutproben direkt nach Entnahme einige Male geschwenkt und mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur ruhen gelassen, bevor sie bis zur weiteren Verarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurden.

2.3 Zellkulturversuche

Für die In-vitro-Versuche wurden in erster Linie Primärmuskelzellkulturen (humane Myotuben) verwendet. Einige Versuche erfolgten mit der leichter verfügbaren Rhabdomyosarkomazelllinie CCL-136 (Institut für angewandte Zellkultur, München).

2.3.1 Kultivierung humaner Myoblasten und Myotuben

Zur Gewinnung humaner Muskelzellkulturen wurden Muskelgewebereste aus Routineoperationen an der Universitätsmedizin Göttingen verwendet. Bei diesen Routineoperationen handelte es sich um Kreuzbandplastiken bei muskelgesunden Patient*innen mit Gewinnung kniegelenksnaher Muskulatur. Nach einem Standardprotokoll wurden die Gewebeproben zunächst kultiviert. Anschließend wurden sie mittels Magnetic Activated Cell Sorting gereinigt, sodass Myoblastenkulturen entstanden. Diese wuchsen adhärent in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter feuchter Atmosphäre bei einem CO_2 -Gehalt von 5 %.

Für die Versuche wurden die Myoblasten nach Ablösung durch Trypsin in 12-*well*-Platten in je 2 ml Wachstumsmedium (Skeletal Muscle Cell Growth Medium + Supplement Mix + Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Sobald die einzelnen *wells* ausreichend bewachsen waren und die Zellen begannen zu konfluieren, wurde das Medium für die Ausdifferenzierung der Zellen zu Myotuben auf ein Differenzierungsmedium umgestellt (Skeletal Muscle Cell Differentiation Medium + Supplement Mix + Penicillin/Streptomycin). Die Myotuben konnten dann im Zellkulturmodell der Einschlusskörpermyositis (s. 2.3.2) weiter untersucht werden.

Für Nebenexperimente wurden nach dem gleichen Protokoll auch Muskeln anderen Ursprungs kultiviert. Diese Muskeln stammen aus Spondylodesen an der Universitätsmedizin Göttingen, die in der Regel im Kindes- oder Jugendalter durchgeführt werden. Dabei wird autochthone Rückenmuskulatur gewonnen. Die Patient*innen leiden häufig neben anderen Vorerkrankungen unter neuromyopathischer Skoliose. Aufgrund möglicher Unterschiede

müssen Experimente mit diesen Muskeln besonders geprüft werden und gelten nicht als etabliertes In-vitro-Modell der IBM.

2.3.2 Exposition zu proinflammatorischen Zytokinen

Für das etablierte Zellkulturmodell der Einschlusskörpermyositis wurden die Myotuben, die aus den oben erwähnten Routineoperationen entstammen, proinflammatorischen Zytokinen ausgesetzt, um die entzündlichen Vorgänge bei der Einschlusskörpermyositis zu imitieren und zu untersuchen. Dafür wurde das Medium nach Spülung der *wells* mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf serumfreies X-Vivo umgestellt und Interferon γ (INF γ , Konzentration 300 U/ml) sowie Interleukin-1 β (IL-1 β , Konzentration 20 ng/ml) zugegeben. Die Exposition erfolgte für 24, 48 oder 72 Stunden; anschließend konnte nach erneuter Spülung mit PBS die weitere Analyse der Zellen erfolgen. Die Kontrollzellen wurden zum Vergleich im reinen X-Vivo Medium gehalten.

2.3.3 Transfektion von Plasmiden durch Lipofectamine

Zur experimentellen Veränderung von mikro-RNA im In-vitro-Modell erfolgten unterschiedliche Transfektionsexperimente. Zunächst erfolgte eine Überexpression von mikro-RNA-146a sowie mikro-RNA-133b mithilfe von Plasmiden, die in Tabelle 4 aufgeführt sind. Auf diesen Plasmiden war ebenfalls das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodiert, sodass während des Versuchs über die Fluoreszenz der Transfektionserfolg überprüft werden konnte. Die Plasmide wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Uwe Michel zur Verfügung gestellt.

Zum Vergleich wurden Zellen entweder nicht transfiziert oder mit einem Kontrollplasmid transfiziert, das keinen Einfluss auf die Expression von mikro-RNAs hat (Mikro-RNA-Kontrolltransfektion).

Die Transfektion erfolgte mithilfe von Lipofectamine nach Herstellerangaben (Lipofectamine 3000 Reagent Protocol). Das Verfahren beruht auf der Lipofektion, also dem Einbringen von genetisch fremdem Material über Liposomen. Das Transfektionsreagenz wurde nach Spülung mit PBS und der Umstellung auf das Differenzierungsmedium zu den Zellen gegeben. Nach 48 Stunden erfolgte der Wechsel auf X-Vivo Medium und die Exposition zu Zytokinen. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Versuche beendet und ausgewertet.

Tabelle 4: Plasmide für die Transfektionsversuche

Funktion	Plasmidbezeichnung (Konzentration)
Kontrollplasmid	pAAV9(5)CB-cytbAS-EGFP-WPRE-bGH (0,2 µg/µl)
mikro-RNA-146a	pAAV9(5)CB-long-miR-146a-EGFP-WPRE-bGH (1,129 µg/µl)
mikro-RNA-133b	pAAV9(5)CB-long-miR-133b-wt-EGFP-WPRE-bGH (1,083 µg/µl)

2.3.4 Transfektion von mikro-RNA durch Lipid-Nanopartikel

Darüber hinaus wurde die Inhibition oder Überexpression von mikro-RNA-146a durch synthetische Oligonukleotide (Mikro-RNA-Inhibitoren oder -Agonisten gemäß Tabelle 5) untersucht. Diese können mithilfe von Lipid-Nanopartikeln eingebracht werden. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Komplexe über LDL-Rezeptoren in die Zellen aufgenommen werden. Zur Herstellung wurden das Neuro9 siRNA Spark Transfection Kit und der NanoAssemblr Spark nach Herstellerangaben in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. André Fischer verwendet.

In den Experimenten wurden nach Wechsel des Mediums auf X-Vivo je 0,5 µl Transfektionsreagenz pro *well* zu den Zellen gegeben. Die Transfektion erfolgte insgesamt für 72 Stunden, nach 24 Stunden unter zusätzlicher Exposition zu Zytokinen für die verbleibenden 48 Stunden. Die Zytokine wurden ohne Mediumwechsel direkt zur Zellkultur hinzugegeben.

Tabelle 5: Oligonukleotide für die Transfektionsversuche

Funktion	Produktbezeichnung	Firma
Mikro-RNA-Kontrolltransfektion	miScript Inhibitor Negative Control	Qiagen
Mikro-RNA-146a-Agonist	Syn-hsa-miR-146a-5p miScript miRNA Mimic	Qiagen
Mikro-RNA-146a-Inhibitor	Anti-hsa-miR-146a-5p miScript miRNA Inhibitor	Qiagen

2.3.5 MHC-I-Immunfluoreszenzfärbung

Vor Aussäen der Muskelzellen wurden Deckgläser mit einem Durchmesser von 10 mm für Immunfluoreszenzfärbungen in die *wells* gelegt. Nach Durchführung der Transfektion und gegebenenfalls Zytokinexposition wurden diese aus den *wells* entnommen und im Anschluss gefärbt.

Für die MHC-I-Färbung wurden die Zellen auf den Deckgläsern 20 Minuten in Aceton fixiert. Anschließend wurde mit bovinem Serumalbumin (BSA) und Ziegen Serum eine Stunde geblockt. Danach erfolgte für eine Stunde die Inkubation mit dem Erstantikörper gegen MHC-I, *rat anti human* HLA ABC von Bio-Rad. Darauf folgte für 45 Minuten die Inkubation mit dem Zweitantikörper, Alexa Fluor 594 *goat anti-rat* IgG (H+L) von Invitrogen. Schließlich wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) die Zellkerne gegengefärbt. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Deckgläser mit PBS oder Tween-PBS gewaschen. Zum Abschluss wurden die Deckgläser mithilfe von Fluoromount oder Glycerol auf Objektträgern eingebettet.

Die Färbungen wurden unter dem Mikroskop Axiovert 200M ausgewertet. Bilder wurden mit der dazugehörigen Software AxioVision aufgenommen und mit ImageJ analysiert.

2.4 RNA-Extraktion

Zur weiteren Analyse der Proben mittels PCR oder Sequenzierung wurde die RNA mit unterschiedlichen Kits isoliert, die die gesamte RNA einschließlich kleiner RNA Moleküle wie mikro-RNA extrahieren.

Bei den Muskelbiopsien wurde das Gewebe initial mit Trizol und Keramik-Kügelchen im Homogenisator aufgespalten, bevor nach Herstellerangaben das RNA Clean and Concentrator-5 Kit inklusive DNase-Anwendung benutzt wurde. Die Elution erfolgte in 20 µl RNase-freiem Wasser.

Die Blutproben wurden zunächst über Nacht aufgetaut, bevor das PAXgene Blood miRNA Kit nach Herstellerangaben angewendet wurde. Die so gewonnene RNA wurde in 40 µl Elutionspuffer gelöst, dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Bei den In-vitro-Versuchen für die Sequenzierung von mikro-RNA wurde zunächst ein Zellpellet hergestellt, aus dem mit dem NucleoSpin miRNA Kit RNA und Protein nach Herstellerangaben, einschließlich des empfohlenen zusätzlichen Waschschrtes, isoliert wurde. Eluiert wurde die RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser. Die Menge des Proteins wurde mit der Messung nach Bradford bestimmt und bei -80 °C für mögliche Folgeuntersuchungen gelagert.

In den übrigen Zellkulturversuchen mit Transfektionen wurde erneut das RNA Clean and Concentrator-5 Kit inklusive DNase mit initialer Trizolanwendung benutzt.

Nach der Extraktion wurden die RNA-Konzentration und -Qualität im Nano Drop One bestimmt. In der Regel und insbesondere für das Sequenzieren wurde eine Konzentration

größer als 33,3 ng/ μ l, ein A260/A280 Absorptionsverhältnis zwischen 1,9 und 2,1 und ein A260/A230 Absorptionsverhältnis größer als 1,3 angestrebt, um eine ausreichende Menge und Reinheit der RNA zu gewährleisten.

Bis zur weiteren Analyse wurde die RNA bei mindestens -80 °C gelagert.

2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung von kleiner RNA, wie beispielsweise mikro-RNA, erfolgte von den Proben aus Biopsien, Blut und In-vitro-Modell. Diese wurde durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. André Fischer am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, unter der Verantwortung von PhD Rezaul Islam (vergleiche Islam et al. 2021), durchgeführt.

Zunächst wurde die ausreichende Qualität der RNA-Proben erneut mithilfe des 2100 Bioanalyzer Instruments sichergestellt. Dann wurde nach Herstellerangaben mit dem NEBNext Small RNA library prep set for Illumina mit initial 100 ng totaler RNA die komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA)-Bibliothek erstellt, kleine RNAs wurden auf Gelbasis angereichert. Das *Next-Generation-Sequencing* erfolgte mit dem HiSeq 2000 Sequencing System mit 50 Basenpaaren langen *sequencing reads*.

Die bioinformatische Analyse der Rohdaten erfolgte unter anderem mit FastQC, miRDeep2 und miRBase22. Sofern benötigt, wurden die Datenbanken Gene Ontology (<http://geneontology.org/>), KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) oder GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) genutzt. Mikro-RNAs mit für multiples Testen korrigiertem p-Wert < 0,05 wurden als differentiell exprimiert, das heißt als signifikant verändert, gewertet. Bei den Ergebnissen der Sequenzierungen entspricht die relative Expression dem $\log_2\text{FoldChange}$, die mittlere relative Expression der $\log_2\text{MeanExpression}$. Die Statistik wurde in R oder mit Graphpad Prism 7 berechnet.

2.6 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Zur weiteren RNA-Analyse wurden quantitative Polymerase-Kettenreaktionen (qPCRs) und Mikro-RNA-qPCRs durchgeführt. Dafür wurde die RNA entsprechend den Herstellerangaben mit dem SuperScript II cDNA Synthese Kit in cDNA umgeschrieben, für die mikro-RNA wurde ebenfalls nach Herstellerangaben das TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit verwendet.

Die qPCR wurde mit dem Real-Time-PCR System QuantStudio 3 durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz bestand aus 10 µl TaqMan Gene Expression MasterMix, 8 µl RNase-freiem Wasser, 1 µl cDNA und 1 µl Primer. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Jede Probe wurde in Triplikaten bestimmt. Das Programm für qPCR und Mikro-RNA-qPCR lief mit je 2 Minuten Initialisierung bei 50 °C, gefolgt von 10 Minuten Hitzestabilisierung bei 95 °C und 45 Zyklen mit 15 Sekunden Denaturierung bei 95 °C sowie 1 Minute Hybridisierung/Elongation bei 60 °C.

Die Ergebnisse wurden mit der QuantStudio Design and Analysis Software und LibreOffice Calc ausgewertet. Als endogene Kontrolle bzw. *housekeeping* Gen wurde für die qPCR Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), für die Mikro-RNA-qPCR mikro-RNA-16 verwendet.

Tabelle 6: TaqMan PCR-Primer/TaqMan Advanced miRNA Assays der Firma Thermo Fisher Scientific

Target	Assay ID
GAPDH	hs99999905
MHC-I	<i>custom designed</i> , APT'Z9ER
iNOS/NOS2	hs00167257
CXCL9	hs00171065
HMGB1	hs01923466
mikro-RNA-16	hsa-miR-16-5p/477860_mir
mikro-RNA-146a	hsa-miR-146a-5p/478399_mir
mikro-RNA-133b	hsa-miR-133b/480871_mir

2.7 Software

Die Auswertung, die Statistik und die Graphen wurden neben den bereits genannten Programmen mit Libre Office, Graphpad Prism 7 und Interactivenn (Heberle et al. 2015) erstellt. Statistische Berechnungen erfolgten mittels One-Way-Anova, für das Signifikanzintervall gilt: * korrigierter p-Wert $\leq 0,05$, ** korrigierter p-Wert $\leq 0,01$ und *** korrigierter p-Wert $\leq 0,001$.

3 Ergebnisse

Um die Expression von mikro-RNA bei der Einschlusskörpermyositis zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit zunächst die Sequenzierung kleiner RNA bei unterschiedlichen Proben durchgeführt. Dies waren einerseits Proben aus dem In-vitro-Zellkulturmodell der Einschlusskörpermyositis, andererseits Patient*innenproben aus Muskelbiopsien und Blut.

Anschließend wurde mit Transfektionen im Zellkulturmodell begonnen, um den Einfluss einzelner mikro-RNAs im proinflammatorischen Milieu weiter zu analysieren. Dafür wurde erst ein Transfektionssystem mit Überexpression der entsprechenden mikro-RNA durch Plasmide genutzt, danach ein Transfektionssystem mit Lipid-Nanopartikeln.

3.1 Sequenzierung vom In-vitro-Modell der IBM

Für das In-vitro-Modell der IBM wurden humane primäre Muskelzellkulturen zu Myotuben fusioniert und 24, 48 oder 72 Stunden einem proinflammatorischen Zellstress durch Exposition zu IFN γ und IL-1 β ausgesetzt (vergleiche 2.3). Dieses entzündliche Milieu entspricht einem etablierten Zellkulturmodell für die IBM. Die Myotuben der Kontrollgruppe wurden nicht zytokinexponiert. Anschließend wurde die gesamte RNA einschließlich kleiner RNA sowie das Protein isoliert (siehe 2.4). Für jede Bedingung wurden die Proben in Triplikaten gesammelt und analysiert. Die fünf unterschiedlichen hierfür genutzten Primärzellkulturen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Primärzellkulturen der sequenzierten Proben

Zellkultur	Geschlecht	Alter (in Jahren)
Muskel 1	w	16
Muskel 2	m	18
Muskel 3	m	22
Muskel 4	w	55
Muskel 5	w	36

m = männlich, w = weiblich.

Muskelzellen reagieren im entzündlichen Milieu unter anderem mit einer verstärkten Expression von MHC-I. Der Erfolg der Zytokinexposition wurde daher anhand der MHC-I-Färbung der Zellen überprüft (Abbildung 1). Pro Bedingung wurden zunächst stellvertretend je Zellen von zwei Deckgläsern gefärbt, bei Auffälligkeiten wurden auch die übrigen für die Sequenzierung verwendeten *wells* überprüft.

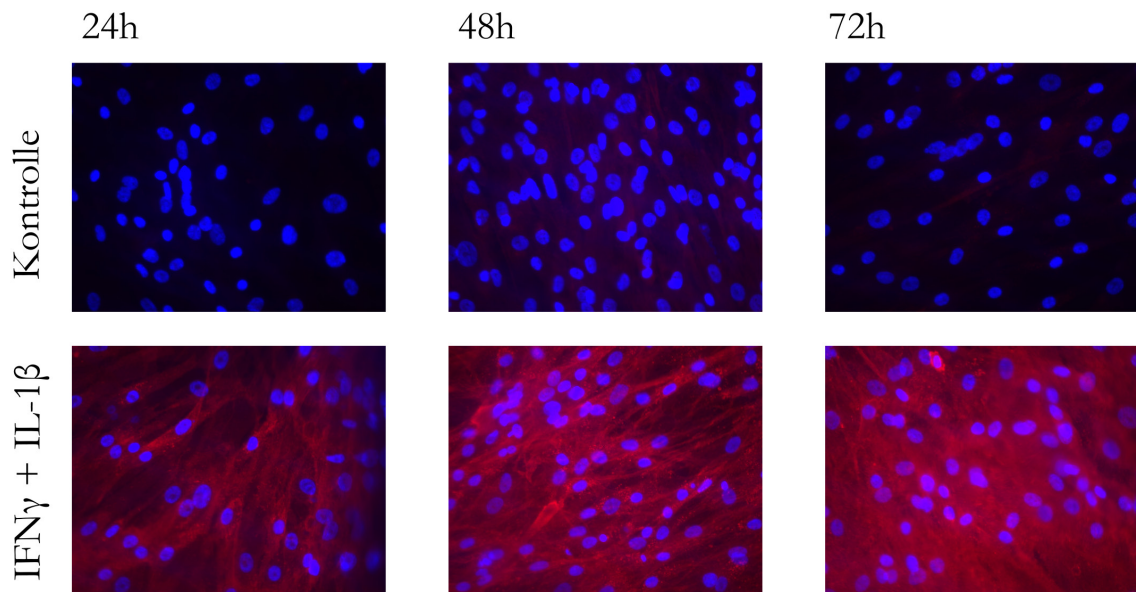


Abbildung 1: MHC-I-Färbung zur Kontrolle der Zytokinexposition

Abgebildet sind beispielhaft MHC-I-Immunfluoreszenzfärbungen von Zellkultur Muskel 1. Nach erfolgreicher Exposition zu Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$, 300 U/ml) und Interleukin-1 β (IL-1 β , 20 ng/ml) für 24, 48 und 72 Stunden exprimierten die Muskelzellen verstärkt MHC-I (rot). Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau), Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung.

Die Sequenzierung der kleinen RNA wurde für die über 24 Stunden zytokinexponierten Proben aller Primärkulturen durchgeführt, die übrigen Proben und das Protein verblieben für Folgeuntersuchungen.

Es waren 106 mikro-RNAs in den Myotuben mit Zytokinexposition im Vergleich zu den nicht exponierten Kontrollen differentiell exprimiert, 30 davon hochreguliert und 76 herunterreguliert; einen Überblick gibt Abbildung 2.

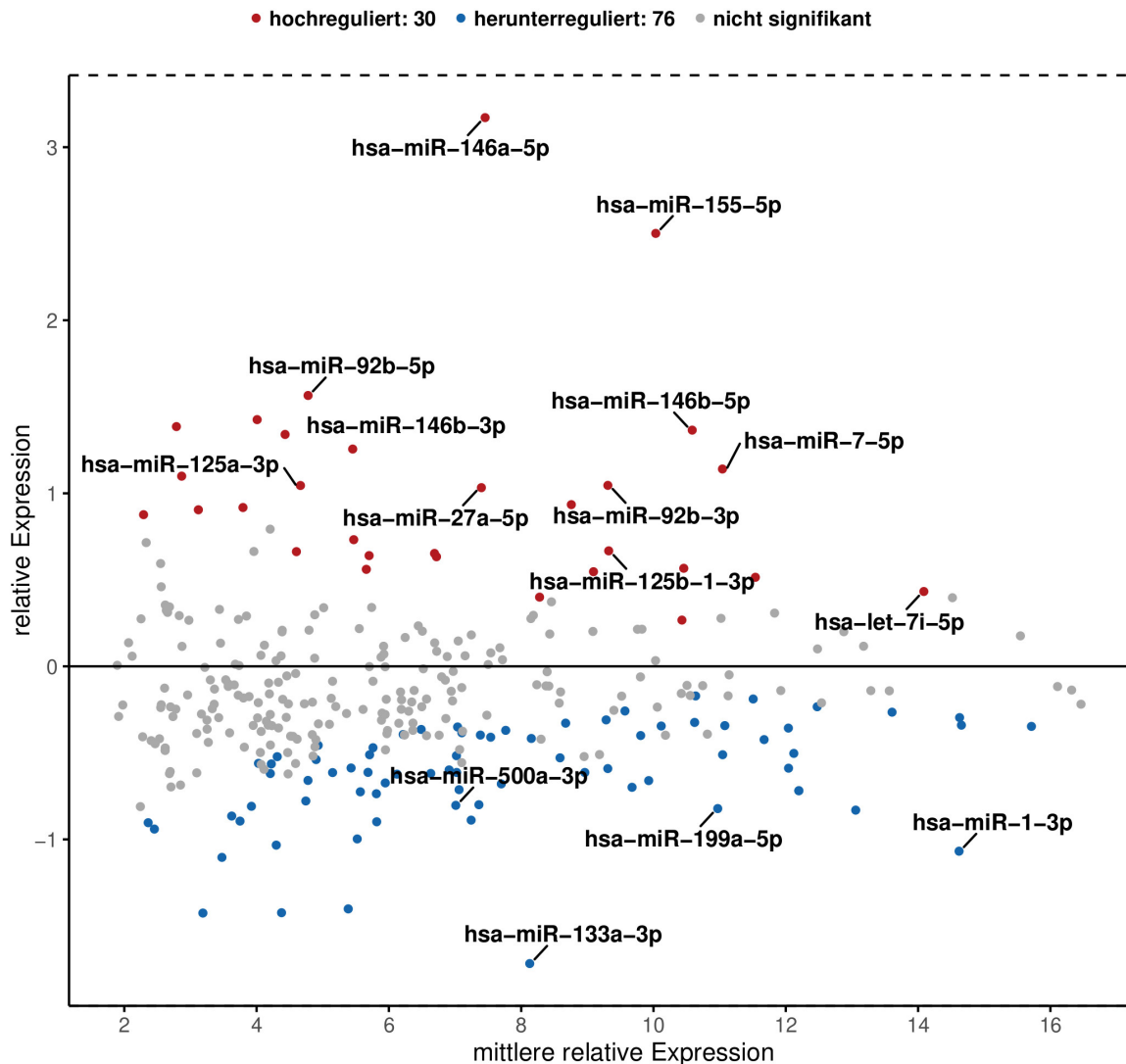


Abbildung 2: Differenziell exprimierte mikro-RNAs im Zellkulturmodell

Dargestellt sind die differenziell exprimierte mikro-RNAs im Vergleich von 24 Stunden Zytokinexposition und Kontrollen im Zellkulturmodell der IBM. Signifikant hochregulierte sind mit einem rotem Punkt markiert, signifikant herunterregulierte mit einem blauem Punkt. Die 15 am signifikantesten veränderten mikro-RNAs sind namentlich beschriftet.

Am signifikantesten differenziell exprimiert war mikro-RNA-155-5p, die hochreguliert in den zytokinexponierten Proben zu finden war. Es folgte mikro-RNA-146a-5p, ebenfalls hochreguliert. Am signifikantesten herunterreguliert war die Expression von mikro-RNA-1-3p. In Tabelle 8 sind die zehn am signifikantesten veränderten mikro-RNAs aufgeführt.

Tabelle 8: Differentiell exprimierte mikro-RNAs im In-vitro-Modell

mikro-RNA	relative Expression	korrigierter p-Wert
hsa-miR-155-5p	2,5019104936923	$1,393 \cdot 10^{-101}$
hsa-miR-146a-5p	3,17100964524535	$4,364 \cdot 10^{-23}$
hsa-miR-92b-3p	1,04597044589848	$2,452 \cdot 10^{-14}$
hsa-miR-1-3p	-1,06796868848129	$9,955 \cdot 10^{-13}$
hsa-miR-27a-5p	1,03270061334413	$1,075 \cdot 10^{-11}$
hsa-miR-146b-5p	1,36518402803665	$6,792 \cdot 10^{-11}$
hsa-miR-500a-3p	-0,802972800069914	$1,463 \cdot 10^{-10}$
hsa-let-7i-5p	0,432638966352331	$3,420 \cdot 10^{-8}$
hsa-miR-133a-3p	-1,71730373938871	$7,329 \cdot 10^{-8}$
hsa-miR-125a-3p	1,04506026038742	$8,629 \cdot 10^{-8}$

Angegeben sind die zehn am signifikantesten differentiell exprimierten mikro- bzw. kleinen RNAs mit relativer Expression als Maß der Expressionsveränderung und korrigiertem p-Wert. Verglichen wurden die nicht zytokinexponierten Kontrollen mit den Myotuben mit Zytokinexposition über 24 Stunden.

In einem Nebenexperiment wurde zusätzlich die kleine RNA aus zwei analogen Versuchen mit Muskeln anderen Ursprungs sequenziert, siehe hierzu 2.3.1. Die Ergebnisse waren hinsichtlich der Mikro-RNA-Expression und der Mikro-RNA-Veränderungen durch Zytokinexposition den dargestellten Ergebnissen ähnlich. Auf die Ausführung dieser zusätzlichen Ergebnisse wird hier verzichtet, da sie dem bereits etablierten In-vitro-Modell nicht vollständig entsprechen und weitere Überprüfung erfordern.

3.2 Sequenzierung von Muskelbiopsien

Um die Ergebnisse des In-vitro-Modells mit Proben von IBM-Patient*innen vergleichen zu können, wurde die RNA von jeweils neun IBM-Muskelbiopsien und muskelgesunden Kontrollproband*innen isoliert, wie unter 2.1 und 2.4 beschrieben. Die Kontrollen wurden passend nach Alter und Geschlecht ausgewählt. Es folgte die Sequenzierung kleiner RNA. In der IBM-Gruppe wurde ein statistischer Ausreißer identifiziert, der nach erneuter Prüfung der zugrundeliegenden Biopsie bei bestehender Unsicherheit der Diagnose von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde.

Anhand der Ergebnisse der Sequenzierung, also der Mikro-RNA-Expressionsmuster, waren die beiden Gruppen deutlich voneinander zu unterscheiden, was in Abbildung 3 ersichtlich wird.

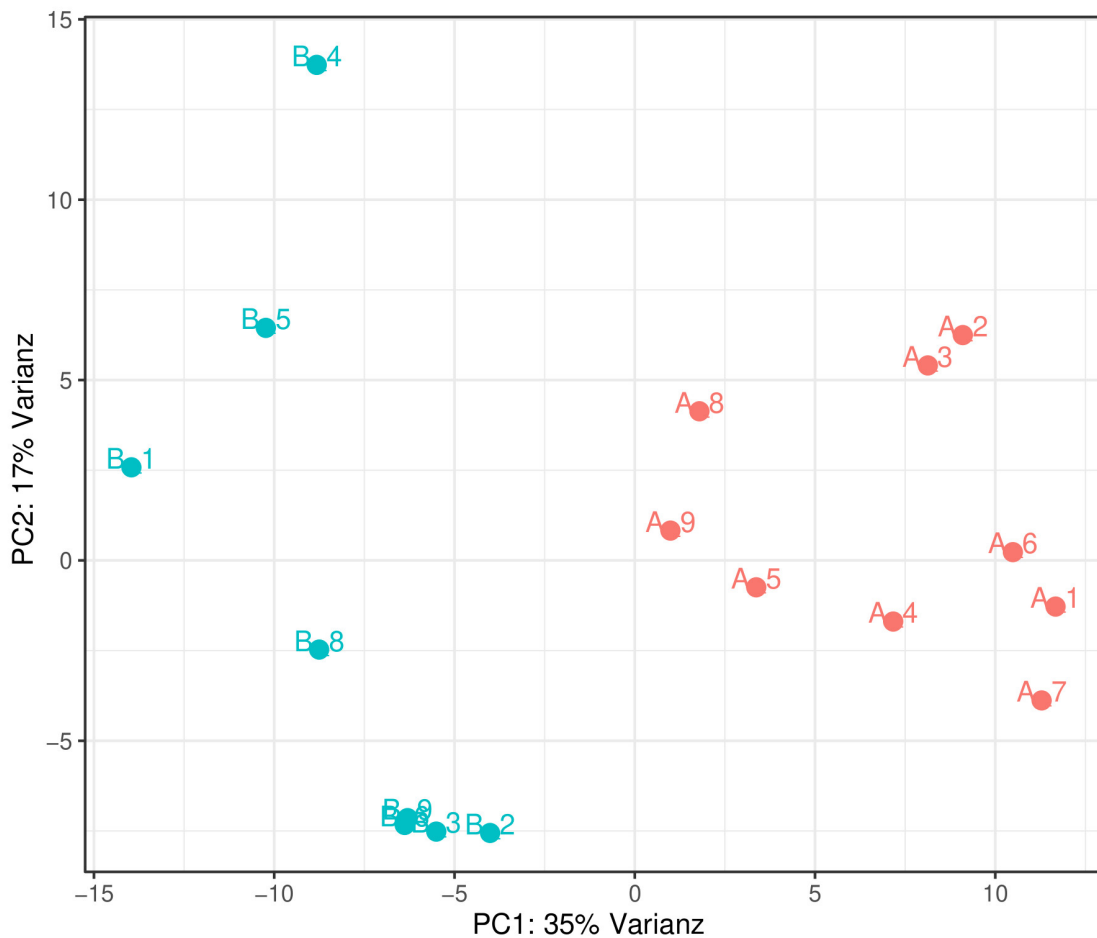


Abbildung 3: PCA-Plot der Muskelbiopsien

Dargestellt ist der PCA-Plot (*Principal Component Analysis*, Hauptkomponentenanalyse) der Daten aus der Sequenzierung der kleinen RNA der Muskelbiopsien. Grundidee dieser Analyse ist es, große Datensätze mit vielen Variablen zu vereinfachen, indem sie auf die wichtigsten, die Varianz erklärenden Hauptkomponenten reduziert werden. Es zeigt sich deutlich die beiden unterschiedlichen Gruppen – A bzw. rot sind die Kontrollen, B bzw. blau die Biopsien der Einschlusskörpermyositis.

Im Vergleich von IBM und Kontrollen waren 258 mikro-RNAs differentiell exprimiert, 134 davon in den IBM-Proben hochreguliert, 124 davon herunterreguliert (Abbildung 4). Die zehn am signifikantesten veränderten mikro-RNAs sind in Tabelle 9 aufgeführt, von denen fünf hochreguliert und fünf herunterreguliert waren. Unter diesen mikro-RNAs fanden sich unter anderem die aus den In-vitro-Modell-Ergebnissen bereits bekannten mikro-RNA-155-5p, mikro-RNA-146a-5p und mikro-RNA-1-3p.

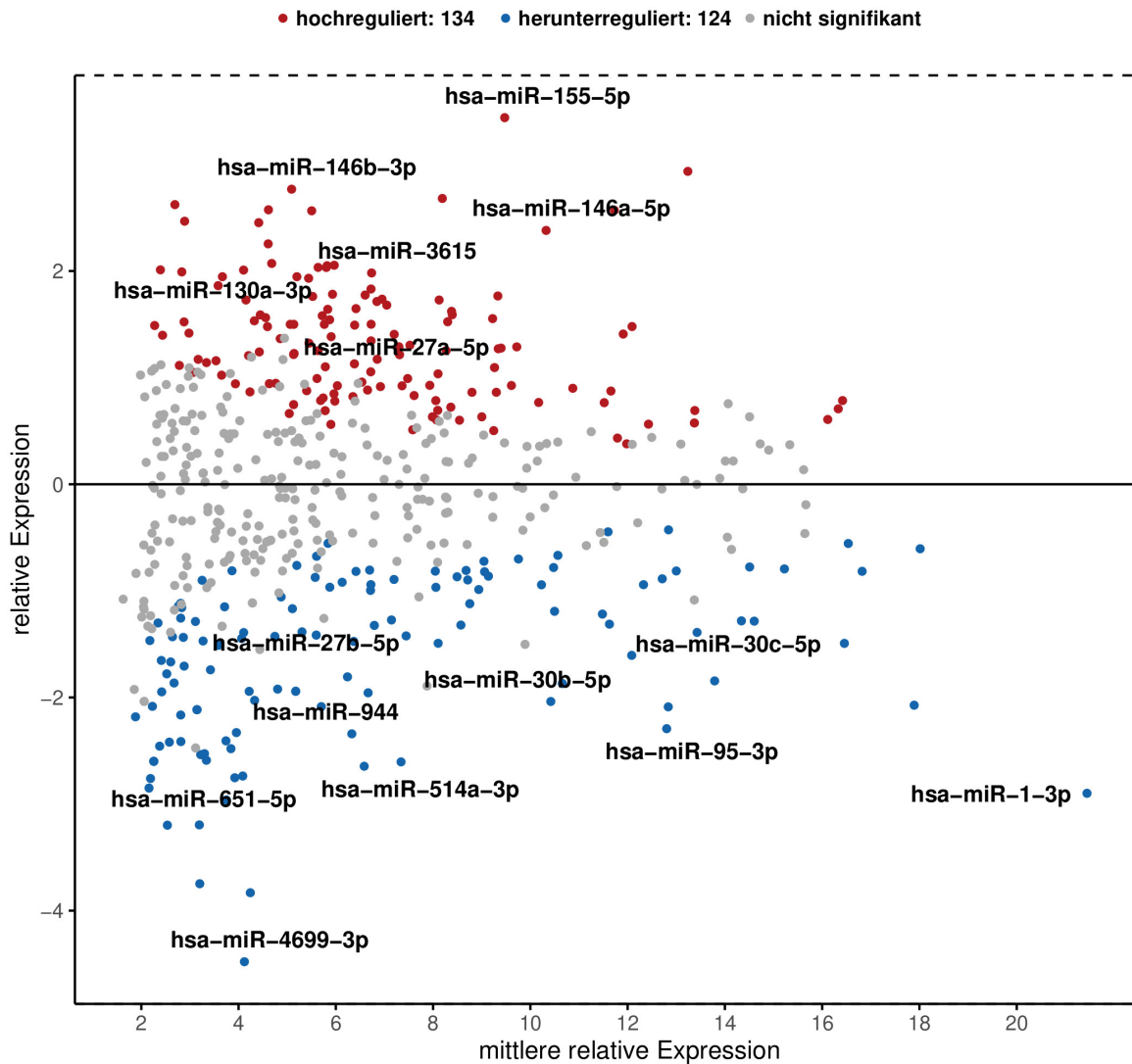


Abbildung 4: Differenziell exprimierte mikro-RNAs der Muskelbiopsien

Dargestellt sind die differenziell exprimierte mikro-RNAs in den IBM-Biopsien im Vergleich zu den Kontrollen. Signifikant hochregulierte sind mit einem roten Punkt markiert, signifikant herunterregulierte mit einem blauen Punkt. Die 15 am signifikantesten veränderten mikro-RNAs sind namentlich beschriftet.

Die differenziell exprimierte mikro-RNAs der IBM-Muskelbiopsien wurden mit denen des In-vitro-Modells verglichen. Es ergaben sich 13 gemeinsam hochregulierte und 26 gemeinsam herunterregulierte mikro-RNAs. Tabelle 10 gibt diese im Einzelnen wieder. Es fanden sich jedoch auch 19 mikro-RNAs, die in den Biopsien hochreguliert, aber beim In-vitro-Modell herunterreguliert waren; sowie eine mikro-RNA, die andersherum beim In-vitro-Modell hochreguliert, bei den Biopsien wiederum herunterreguliert war.

Tabelle 9: Differenziell exprimierte mikro-RNAs der Muskelbiopsien

	relative Expression	korrigierter p-Wert
hsa-miR-155-5p	3,43925140375278	$4,029 \cdot 10^{-20}$
hsa-miR-27b-5p	-1,27294692182726	$2,299 \cdot 10^{-13}$
hsa-miR-146a-5p	2,38116543654166	$2,051 \cdot 10^{-12}$
hsa-miR-95-3p	-2,29280798440161	$3,941 \cdot 10^{-11}$
hsa-miR-1-3p	-2,89886985240394	$4,482 \cdot 10^{-11}$
hsa-miR-651-5p	-2,73685595698416	$4,482 \cdot 10^{-11}$
hsa-miR-3615	1,98212263244875	$2,573 \cdot 10^{-9}$
hsa-miR-514a-3p	-2,64505453745329	$3,426 \cdot 10^{-9}$
hsa-miR-146b-3p	2,76778059423096	$9,885 \cdot 10^{-9}$
hsa-miR-27a-5p	1,50090801560834	$9,885 \cdot 10^{-9}$

Angegeben sind die zehn am signifikantesten veränderten mikro-RNAs der Muskelbiopsien im Vergleich zu Kontrollen mit relativer Expression und korrigiertem p-Wert. Davon waren jeweils fünf hochreguliert (positive relative Expression) und fünf herunterreguliert (negative relative Expression).

Tabelle 10: Vergleich der differenziell exprimierten mikro-RNAs des In-vitro-Modells und der Muskelbiopsien

hochreguliert	herunterreguliert	
hsa-miR-155-5p	hsa-miR-1-3p	hsa-miR-450b-5p
hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-133a-3p	hsa-miR-95-3p
hsa-miR-92b-3p	hsa-miR-133b	hsa-miR-374b-5p
hsa-miR-27a-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-98-5p
hsa-miR-146b-5p	hsa-let-7g-5p	hsa-miR-30c-5p
hsa-miR-92b-5p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-26a-5p
hsa-miR-146b-3p	hsa-let-7a-3p	hsa-miR-340-5p
hsa-miR-125b-1-3p	hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-378d
hsa-miR-27a-3p	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-133a-5p
hsa-miR-3615	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-1296-5p
hsa-miR-142-5p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-30a-5p
hsa-miR-195-3p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-152-3p
hsa-miR-218-5p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-181a-2-3p

Auflistung der sowohl im In-vitro-Modell als auch bei IBM-Biopsien signifikant hoch- oder herunterregulierten mikro-RNAs.

Trotz geringfügiger Unterschiede scheint das In-vitro-Modell in Hinsicht auf die Mikro-RNA-Veränderungen den Biopsien ähnlich. Das zeigte sich auch in der starken Korrelation der gemeinsam hochregulierten mikro-RNAs bezüglich der relativen Expression als quantitativem Maß der Expressionsveränderung mit einem Korrelationskoeffizient $r = 0,71$. Ähnliches fand sich bei den gemeinsam herunterregulierten mikro-RNAs mit $r = 0,5$; Abbildung 5.

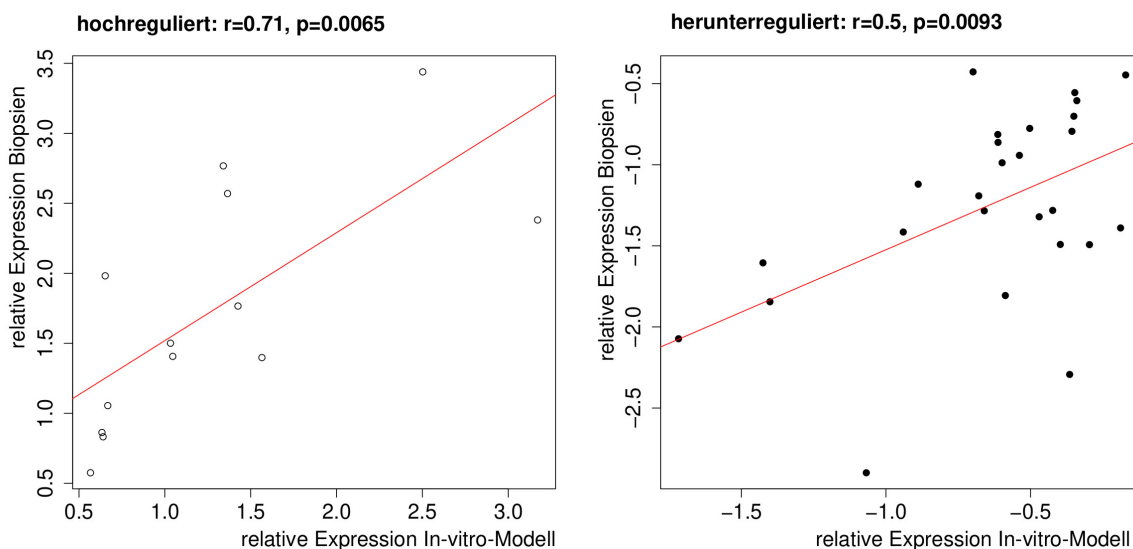


Abbildung 5: Korrelation gemeinsam differentiell exprimierter mikro-RNAs von In-vitro-Modell und Biopsien

Gezeigt ist die Korrelation der relativen Expressionswerte der gemeinsam differentiell exprimierten mikro-RNAs im Vergleich von In-vitro-Modell und Biopsien, links der hochregulierten, rechts der herunterregulierten mikro-RNAs.

3.3 Sequenzierung von Blutproben

Um die Mikro-RNA-Expression bei der IBM im Vergleich zu anderen Erkrankungen weiter zu charakterisieren, wurde auch Blut untersucht. Es wurden Proben von Patient*innen mit unterschiedlichen Erkrankungen (IBM, Dermatomyositis, Antisynthetase-Syndrom, Chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie und Myotone Dystrophie Typ 1) sowie von nicht myopathisch und nicht inflammatorisch erkrankten Kontrollproband*innen gesammelt und die RNA einschließlich der mikro-RNA aus Vollblut isoliert, wie in 2.2 und 2.4 beschrieben. Erneut folgte die Sequenzierung kleiner RNA, zunächst von den jeweils zehn IBM-Patient*innen und der Kontrollgruppe. Die Analyse der übrigen Proben wird in einem Folgeprojekt durchgeführt.

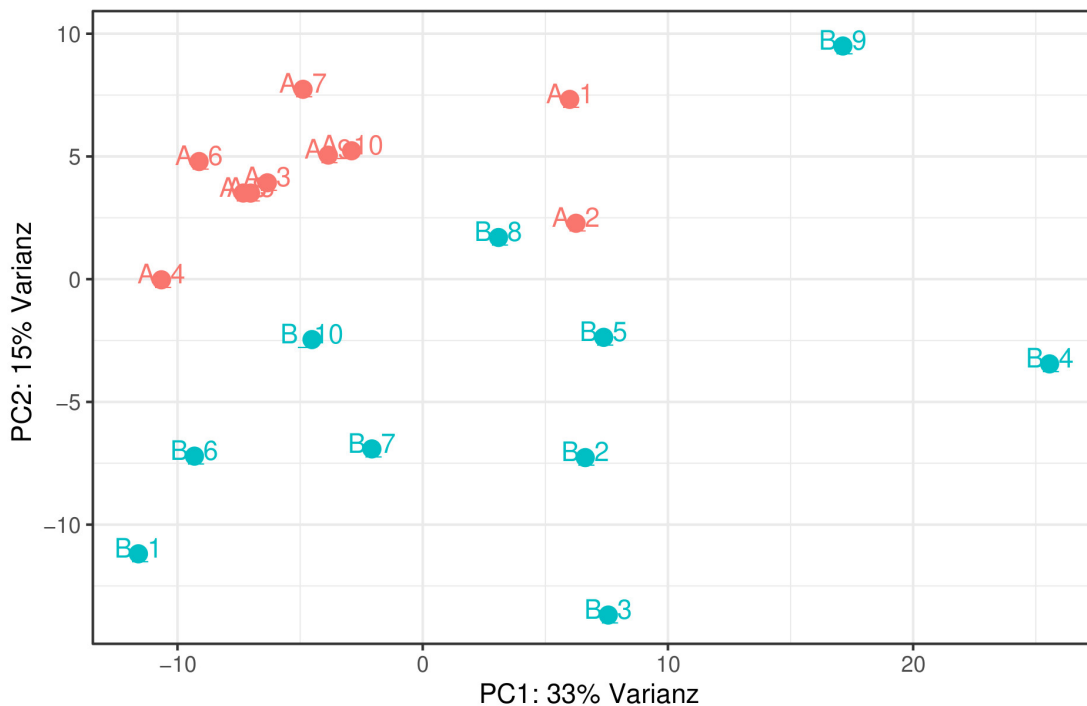


Abbildung 6: PCA-Plot der Blutproben

Dargestellt ist der PCA-Plot der Daten aus der Sequenzierung der kleinen RNA der Blutproben von IBM-Patient*innen und Kontrollproband*innen. Wie für die Biopsiedaten ausgeführt, sollen große Datensätze mit vielen Variablen vereinfacht werden, indem sie auf die wichtigsten, die Varianz erklärenden Hauptkomponenten reduziert werden. A bzw. rot sind die Kontrollen, B bzw. blau die Blutproben der IBM. Vor allem die Kontrollen bildeten eine eher einheitliche Gruppe und schienen sich so von den IBM-Proben abzugrenzen.

Die IBM-Blutproben und die Kontrollproben wiesen unterschiedliche Mikro-RNA-Expressionsmuster auf und bildeten getrennte Gruppen, wie in Abbildung 6 dargestellt.

Im Vergleich der IBM- und Kontrollblutproben waren 169 mikro-RNAs differentiell exprimiert. Dabei waren 100 mikro-RNAs bei den IBM-Proben hochreguliert, 69 herunterreguliert. Eine Übersicht bietet Abbildung 7. Die zehn am signifikantesten veränderten mikro-RNAs sind in Tabelle 11 gelistet, davon waren drei hochreguliert, die übrigen herunterreguliert.

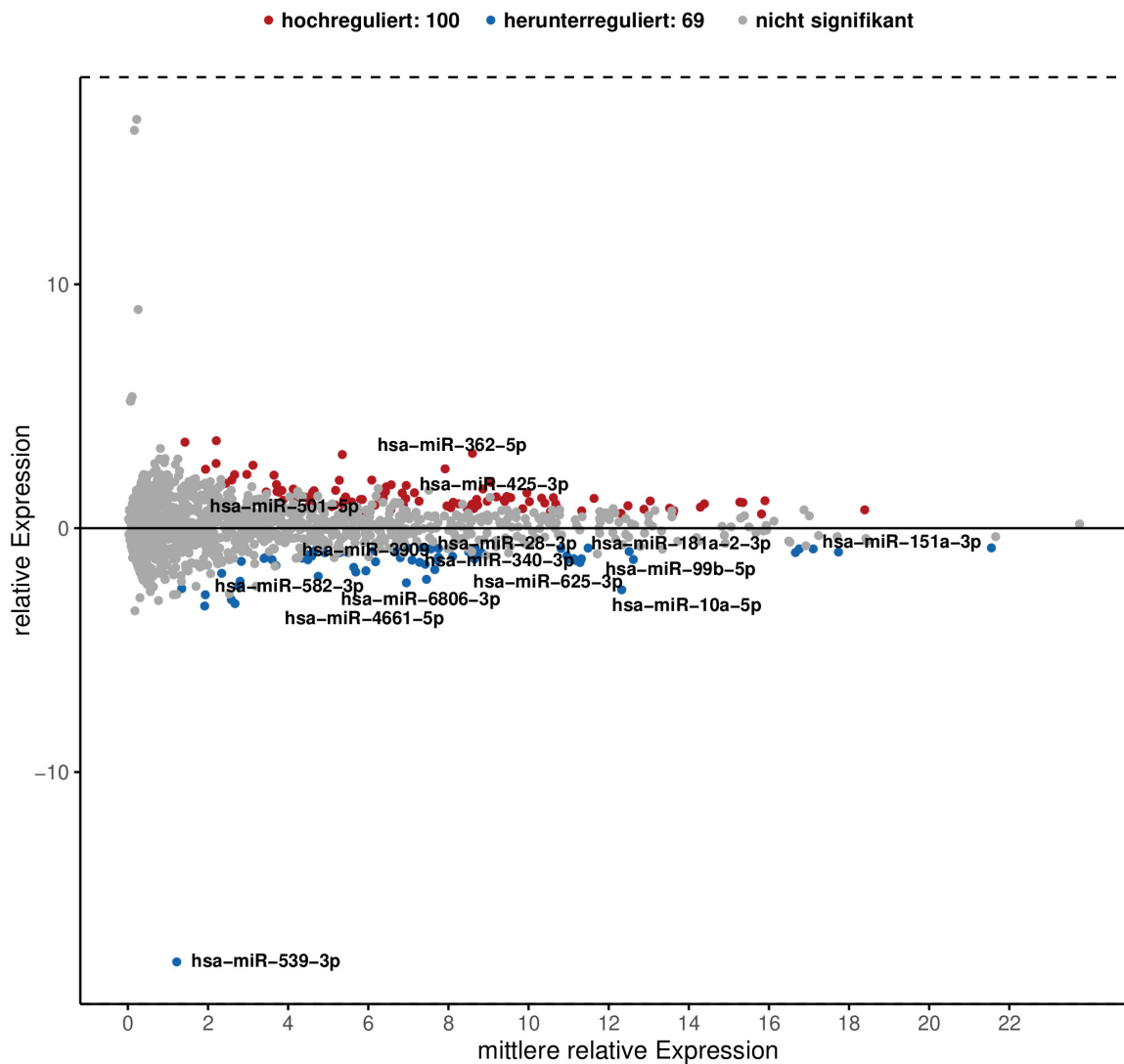


Abbildung 7: Differenziell exprimierte mikro-RNAs der Blutproben

Dargestellt sind die differenziell exprimierte mikro-RNAs der IBM-Blutproben im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikant hochregulierte sind mit einem roten Punkt markiert, signifikant herunterregulierte mit einem blauen Punkt. Die 15 am signifikantesten veränderten mikro-RNAs sind namentlich beschriftet.

Verglichen mit den Ergebnissen der Sequenzierung der anderen Proben fanden sich in den Sequenzierungsergebnissen der Blutproben sowohl einige Überschneidungen als auch einige Unterschiede. In den Blutproben waren mikro-RNA-155, -146a, -1 und -133 nicht differenziell exprimiert, die bei den anderen Proben zu den am signifikantesten veränderten mikro-RNAs gehörten. Dazu gehörte auch mikro-RNA-146b. Diese war bei den Blutproben zwar ebenfalls differenziell exprimiert, jedoch herunterreguliert, während sie bei den anderen Proben hochreguliert war. Tabelle 12 gibt eine Übersicht, wie viele mikro-RNAs jeweils im Vergleich von Blutproben und Muskelbiopsien oder In-vitro-Modell gemeinsam oder entgegengesetzt differenziell exprimiert waren.

Tabelle 11: Differenziell exprimierte mikro-RNAs der Blutproben

	relative Expression	korrigierter p-Wert
hsa-miR-10a-5p	-2,52524718601216	$3,673 \cdot 10^{-11}$
hsa-miR-181a-2-3p	-1,25322840252847	$4,787 \cdot 10^{-11}$
hsa-miR-362-5p	2,43471482642367	$4,723 \cdot 10^{-10}$
hsa-miR-28-3p	-1,1303348965581	$4,723 \cdot 10^{-10}$
hsa-miR-501-5p	1,78030614589302	$3,485 \cdot 10^{-7}$
hsa-miR-539-3p	-17,7808954282427	$8,995 \cdot 10^{-7}$
hsa-miR-625-3p	-1,2659054139194	$3,407 \cdot 10^{-6}$
hsa-miR-6806-3p	-1,25639730831912	$3,407 \cdot 10^{-6}$
hsa-miR-151a-3p	-0,974827585778537	$3,509 \cdot 10^{-6}$
hsa-miR-425-3p	1,10577094082946	$3,863 \cdot 10^{-6}$

Angegeben sind die zehn am signifikantesten veränderten mikro-RNAs der IBM-Blutproben im Vergleich zur Kontrollgruppe mit relativer Expression und korrigiertem p-Wert. Davon waren drei hochreguliert (positive relative Expression) und sieben herunterreguliert (negative relative Expression).

Tabelle 12: Vergleich der differenziell exprimierten mikro-RNAs von Blutproben und Muskelbiopsien oder In-vitro-Modell

Blutproben	Muskel- biopsien	Anzahl mikro- RNAs	Blutproben	In-vitro-Modell	Anzahl mikro- RNAs
hochreguliert	hochreguliert	21	hochreguliert	hochreguliert	1
hochreguliert	herunterreguliert	10	hochreguliert	herunterreguliert	12
herunterreguliert	herunterreguliert	8	herunterreguliert	herunterreguliert	7
herunterreguliert	hochreguliert	13	herunterreguliert	hochreguliert	2

Angegeben ist jeweils die Anzahl der differenziell exprimierten mikro-RNAs, die sich zwischen Blutproben und Muskelbiopsien (links) bzw. zwischen Blutproben und In-vitro-Modell (rechts) überschneiden. Grundlage waren die im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle differenziell exprimierten mikro-RNAs von Blutproben (IBM gegenüber Kontrollen), Muskelbiopsien (IBM gegenüber Kontrollen) und In-vitro-Modell (zytokinexponierte Myotuben gegenüber nicht exponierten). Diese differenziell exprimierten mikro-RNAs konnten hoch- oder herunterreguliert sein. Im Vergleich der Blutproben mit den anderen beiden Gruppen gab es gemeinsam hoch- oder herunterregulierte mikro-RNAs sowie je entgegengesetzt veränderte. Auf die namentliche Auflistung dieser sich überschneidender mikro-RNAs wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet.

Lediglich eine mikro-RNA war in allen drei Gruppen hochreguliert. In Blutproben, Muskelbiopsien und im In-Vitro-Modell war mikro-RNA-92b-5p im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle vermehrt nachweisbar. Zwei mikro-RNAs waren in allen drei Gruppen herunterreguliert: mikro-RNA-30a-5p und mikro-RNA-181a-2-3p.

3.4 Transfektionen im Zellkulturmodell mit Plasmiden

Um den Einfluss der Mikro-RNA-Veränderungen im Zellkulturmodell der IBM zu untersuchen, wurden verschiedene Transfektionen durchgeführt. Dafür wurden basierend auf den Ergebnissen der Sequenzierung und dem aktuellen Kenntnisstand eine Überexpression oder Inhibition von mikro-RNA-146a und mikro-RNA-133 gewählt.

Anfangs wurde mit den Myoblasten der Rhabdomyosarkomzelllinie CCL-136 Zellen gearbeitet, da diese als leichter zu transfizieren gelten als Myotuben. Aufgrund der im Vergleich zu den Myotuben kurzen Verdopplungszeit dieser Zelllinie wurde jedoch keine stabile Transfektion eines ausreichenden Teils der Zellen erreicht.

Deshalb wurde für die Versuche das bereits beschriebene In-vitro-Modell mit humanen Myotuben genutzt und mithilfe von Lipofectamine mit Plasmiden transfiziert, siehe 2.3.3. Die Plasmide sorgten für eine Überexpression von mikro-RNA-133b oder mikro-RNA-146a. Zusätzlich wurde zum Vergleich ein Plasmid ohne Einfluss auf mikro-RNA transfiziert (Mikro-RNA-Kontrolltransfektion) sowie Kontrollzellen ohne Transfektion (Kontrolle) betrachtet. Die Zellen wurden 48 Stunden mit den Plasmiden inkubiert, bevor sie zusätzlich für weitere 48 Stunden den proinflammatorischen Zytokinen exponiert wurden. Vergleichend wurden alle Gruppen auch ohne zusätzliche Zytokinexposition untersucht. Das Experiment wurde mit vier unterschiedlichen Primärkulturen wiederholt.

3.4.1 Überprüfung der Transfektion und der Mikro-RNA-Expression

In der Auswertung wurde zunächst der Erfolg der Transfektion überprüft. Die Plasmide kodierten zusätzlich für GFP, sodass transfizierte Zellen während des Versuchs grün fluoreszierten. Nach Abschluss der Versuche war das GFP-Signal der Zellen auf den Deckgläsern nicht mehr detektierbar. Trotz unterschiedlicher Versuche mit verschiedenen Fixierungen und einem Anti-GFP-Antikörper ließ sich GFP im Nachhinein nicht anfärben, weshalb die Transfektionsrate nicht sicher bestimmt werden konnte. Geschätzt anhand des GFP-Signals vor Abschluss der Versuche lag sie bei maximal 50 %, also eher gering. Das ist jedoch kein

verlässlicher Wert, unter anderem weil die Grenzen der einzelnen Zellen ohne zusätzliche Färbung kaum zu definieren waren.

Aufgrund der bestehenden GFP-Expression war trotzdem von einem Anteil erfolgreich transfizierter Zellen auszugehen. Zur weiteren Auswertung der gewünschten Überexpression von mikro-RNA-146a und mikro-RNA-133b wurde eine Mikro-RNA-qPCR durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 8 dargestellt sind. Als endogene Kontrolle wurde mikro-RNA-16 ausgewählt. Diese zeigte ein stabiles Expressionsniveau in allen Bedingungen.

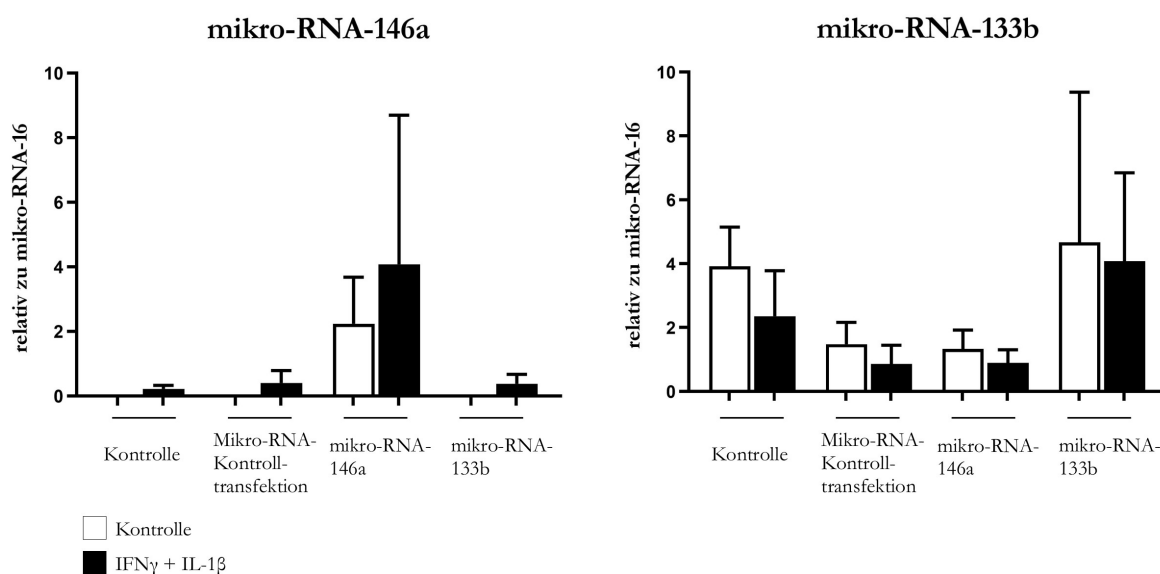


Abbildung 8: Mikro-RNA-PCR der Plasmid-Transfektionsexperimente

Zur Übersicht sind alle Transfektionsexperimente mit Plasmiden in der Grafik zusammengefasst, dargestellt ist die Expression von mikro-RNA-146a (links) und mikro-RNA-133b (rechts) relativ zur endogenen Kontrolle mikro-RNA-16 mit Mittelwerten und Standardabweichungen. Zytokinexposition (IFN γ + IL-1 β = Exposition zu Interferon γ und Interleukin-1 β) führte in jeder Gruppe zum Anstieg von mikro-RNA-146a und Abfall von mikro-RNA-133b. Die Überexpression von mikro-RNA-146a funktionierte, von mikro-RNA-133b dagegen nur in einem von drei Versuchen deutlich. Aufgrund der großen Variabilität der biologisch unterschiedlichen Primärkulturen unterschied sich das allgemeine Expressionslevel zwischen den einzelnen Versuchen teils stark, resultierend in großen Standardabweichungen in der Zusammenfassung. Die Auswertung erfolgte für jeden Versuch einzeln.

Mikro-RNA-146a war in drei von vier Versuchen durch die Transfektion mit dem entsprechenden Plasmid deutlich überexprimiert, in einem gering. Außerdem war sie ausnahmslos in den zytokinexponierten Proben erhöht im Vergleich zu den nicht exponierten und bestätigte damit die Ergebnisse der Sequenzierung.

Mikro-RNA-133b hingegen fand sich stets vermindert bei Zytokinexposition; auch das bestätigte die Ergebnisse der Sequenzierung. Die Überexpression durch das Plasmid funktionierte in einem von drei Versuchen deutlich, in den anderen beiden allenfalls mäßig. Der Grund, aus dem das Plasmid mit Mikro-RNA-146a-Überexpression scheinbar besser funktionierte, blieb unklar. Allerdings wurde deshalb im letzten Versuch auf das Mikro-RNA-133b-Plasmid verzichtet.

3.4.2 Kontrolle der Exposition zu proinflammatorischen Zytokinen

Außerdem wurde der Erfolg der Zytokinexposition kontrolliert. So erfolgte erneut eine MHC-I-Färbung der Zellen aus den Experimenten. Unabhängig von den Transfektionen zeigte sich stets eine deutlich verstärkte MHC-I-Expression in den zytokinexponierten Zellen, dies ist beispielhaft in Abbildung 9 gezeigt.

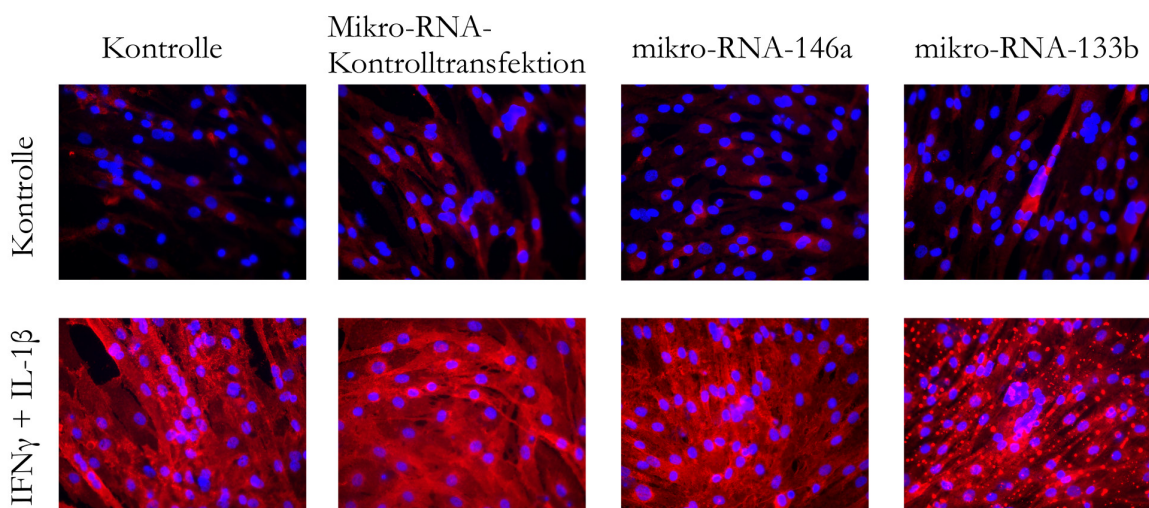


Abbildung 9: MHC-I-Färbung der Plasmid-Transfektionsexperimente

MHC-I-Immunfluoreszenzfärbung der Zellen der Transfektionsexperimente, MHC-I erscheint rot, die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI erscheint blau. In der oberen Reihe finden sich die Kontrolle, die Mikro-RNA-Kontrolltransfektion und die Transfektionen mit den Plasmiden mit Überexpression von mikro-RNA-146a und -133b jeweils ohne Zytokinexposition (Kontrolle), in der unteren Reihe jeweils mit proinflammatorischer Zytokinexposition (IFN γ + IL-1 β). Diese führte zu vermehrter MHC-I-Expression. Auch schien die Lipofectamine-Transfektion selbst zu leicht erhöhter MHC-I-Expression bei den nicht zytokinexponierten Zellen zu führen. Ähnliche Ergebnisse wurden in allen Wiederholungen gesehen, aufgenommen wurde in 40-facher Vergrößerung.

Im Vergleich aller Färbungen wurde bei den nicht zytokinexponierten Zellen eine milde Erhöhung der MHC-I-Expression durch die Transfektion selbst sichtbar. Es zeigten sich

jedoch keine Unterschiede zwischen den transfizierten Gruppen, weswegen von einem leichten proinflammatorischen Effekt durch die Lipofectamine-Transfektion auszugehen ist. Diese Wirkung war auch lichtmikroskopisch während der Versuche anhand einer leicht erhöhten Zelltodrate erkennbar.

Die sichtbaren Veränderungen wurden zusätzlich quantitativ mittels Graustufenanalyse ausgewertet. Hierzu wurde ausschließlich der rot fluoreszierende Kanal, der die MHC-I-Expression erfasst, mit ImageJ hinsichtlich der mittleren Helligkeit im Graustufenbild untersucht. In der Zusammenfassung aller Experimente waren alle zytokinexponierten Proben statistisch signifikant heller als die Kontrolle. Auch zeigte sich erneut der leicht proinflammatorische Effekt der Transfektion selbst (nicht signifikant). Darüber hinaus gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen, siehe Abbildung 10.

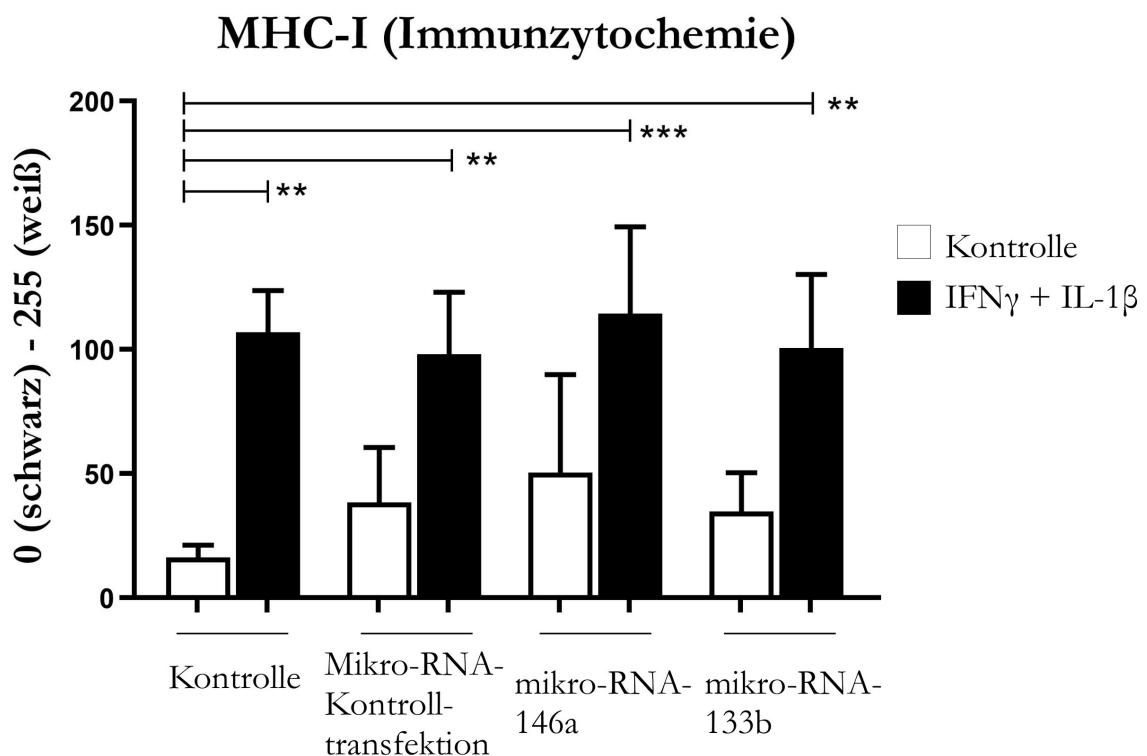


Abbildung 10: Graustufenanalyse der MHC-I-Immunfluoreszenzfärbung der Plasmid-Transfektionsexperimente

Die Auswertung der mittleren Helligkeit der MHC-I-Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen aus den Transfektionsexperimenten mit Plasmiden erfolgte mit ImageJ. Der Zytokinexpositionseffekt (IFN γ + IL-1 β = Exposition zu Interferon γ und Interleukin-1 β) war in allen Gruppen sichtbar, beispielhaft wurde der signifikante Unterschied zwischen Kontrolle und zytokinexponierten Gruppen eingetragen. Darstellung als Balkendiagramm mit Mittelwerten und Standardabweichungen.

3.4.3 Analyse von Zellstressmarkern

Um die Auswirkungen der Überexpression der mikro-RNAs zu untersuchen, erfolgten qPCRs der Zellstressmarker MHC-I, iNOS und CXCL9 (Abbildung 11). Jeder dieser Marker sollte im inflammatorischen Milieu verstärkt exprimiert werden und war auf Ebene der mRNA in den zytokinexponierten Proben gegenüber den nicht exponierten Proben stets erhöht.

Für CXCL9 zeigten sich in den transfizierten Gruppen keine zusätzlichen Unterschiede. Bei iNOS gab es eine Tendenz zur verstärkten Expression bei Kombination aus Zytokinexposition und Transfektion im Vergleich zu zytokinexponierter Kontrolle, jedoch keine Unterschiede zwischen Mikro-RNA-Kontrolltransfektion und Mikro-RNA-Überexpression. Das bestätigt am ehesten den leichten proinflammatorischen Effekt der Lipofectamine-Transfektion, der sich bereits in den MHC-I-Färbungen zeigte. Diese Tendenz wurde ebenfalls in den PCR-Ergebnissen für MHC-I ersichtlich.

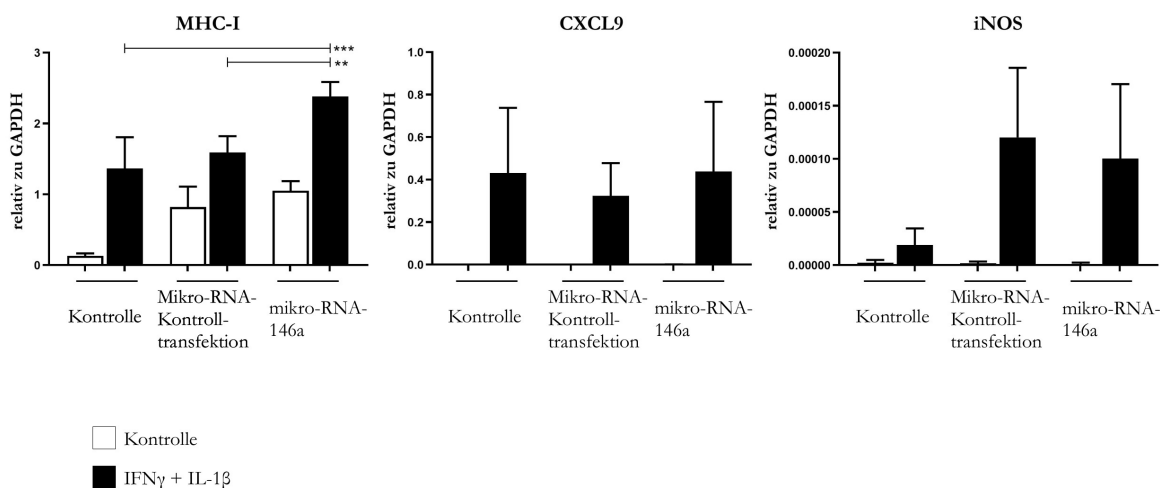


Abbildung 11: PCR der Zellstressmarker bei Plasmid-Transfektionsexperimenten

Dargestellt sind die PCR-Ergebnisse der Plasmid-Transfektionsexperimente für MHC-I, CXCL9 und iNOS für die Gruppen Kontrolle, Mikro-RNA-Kontrolltransfektion und Mikro-RNA-146a-Überexpression jeweils nicht zytokinexponiert und mit Zytokinexposition ($\text{IFN}\gamma + \text{IL-1}\beta$); auf die Darstellung der Gruppe mit Überexpression von mikro-RNA-133b wurde verzichtet, da diese nicht sicher funktionierte. Die Zytokinexposition führte zu verstärkter Expression aller Marker, häufig war dieser Unterschied signifikant. MHC-I war unter den zytokinexponierten Gruppen signifikant erhöht bei Mikro-RNA-146a-Überexpression (korrigierter p-Wert = 0,004 gegenüber zytokinexponierter Mikro-RNA-Kontrolltransfektion und 0,0003 gegenüber zytokinexponierter Kontrolle). Die Ergebnisse aller Versuche wurden zusammengefasst, angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen im Balkendiagramm; die Normalisierung erfolgte auf die Expression von GAPDH.

Die MHC-I-Expression war außerdem durch die Überexpression von mikro-RNA-146a tendenziell zusätzlich erhöht, insbesondere in Kombination mit Zytokinexposition. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied, sowohl verglichen mit zytokinexponierter Kontrolle als auch mit zytokinexponierter Mikro-RNA-Kontrolltransfektion.

Zusammenfassend waren die Ergebnisse bezüglich mikro-RNA-133b nicht kohärent, bei nur geringem technischem Erfolg der Überexpression dieser mikro-RNA sind deshalb weitere Versuche für eine Beurteilung ihrer Auswirkung auf den Zellstress nötig.

Die Überexpression von mikro-RNA-146a führte vor allem in Kombination mit Zytokinexposition zur Verstärkung der MHC-I-Expression, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die anderen Marker.

3.5 Transfektionen im Zellkulturmodell durch Lipid-Nanopartikel

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Transfektion durch Lipofectamine, eine ausreichende Transfektionsrate zu erreichen und dem proinflammatorischen Effekt dieser Methode auf die Myotuben, wurde für weitere Versuche ein anderes Transfektionssystem genutzt. Mithilfe von Lipid-Nanopartikeln wurden erneut humane Myotuben transfiziert, eingebracht wurden synthetische Oligonukleotide. Auf den vorherigen Ergebnissen aufbauend wurde mikro-RNA-146a-5p mit einem Agonist überexprimiert und mit einem Inhibitor ausgeschaltet, zum Vergleich dienten nicht transfizierte Kontrolle und Mikro-RNA-Kontrolltransfektion, siehe 2.3.4. Die Transfektion erfolgte mit 0,5 µl Transfektionsreagenz pro *well* für 72 Stunden, gegebenenfalls gefolgt von zusätzlicher Zytokinexposition in den letzten 48 Stunden. Auch hier wurde jede Gruppe zum Vergleich ohne Zytokinexposition betrachtet. Das Experiment wurde mit vier verschiedenen Primärkulturen durchgeführt, jede Bedingung in Triplikaten.

3.5.1 Überprüfung der Transfektion und der Mikro-RNA-Expression

Der Erfolg der Transfektion durch Lipid-Nanopartikel wurde anhand einer Mikro-RNA-qPCR kontrolliert (Abbildung 12).

Die Transfektion mit dem Mikro-RNA-146a-Agonist führte in jedem Versuch zur starken und signifikanten Überexpression der entsprechenden mikro-RNA, sodass von erfolgreicher Transfektion auszugehen ist.

Nebenbei zeigte sich auch hier durch die Zytokinexposition stets ein Anstieg von mikro-RNA-146a, der wesentlich geringer als der Anstieg durch den Agonisten war. Die Transfektion des Agonisten führte somit möglicherweise zur Überexpression weit über das physiologische Level der mikro-RNA hinaus.

Der Mikro-RNA-146a-Inhibitor bewirkte keine Senkung der Mikro-RNA-146a-Menge, wobei die allgemeine Expressionshöhe von mikro-RNA-146a in den verwendeten Myotuben ohne Zytokinexposition ohnehin sehr gering war und folglich ein Inhibitor diese kaum noch senken konnte. Trotzdem verhinderte der Inhibitor auch nicht sicher den Anstieg von mikro-RNA-146a durch Zytokinexposition und zeigte in der weiteren Auswertung keine konsistenten Effekte. Daher wurde davon ausgegangen, dass entweder die Transfektion oder wahrscheinlicher der Inhibitor selbst nicht funktionierte.

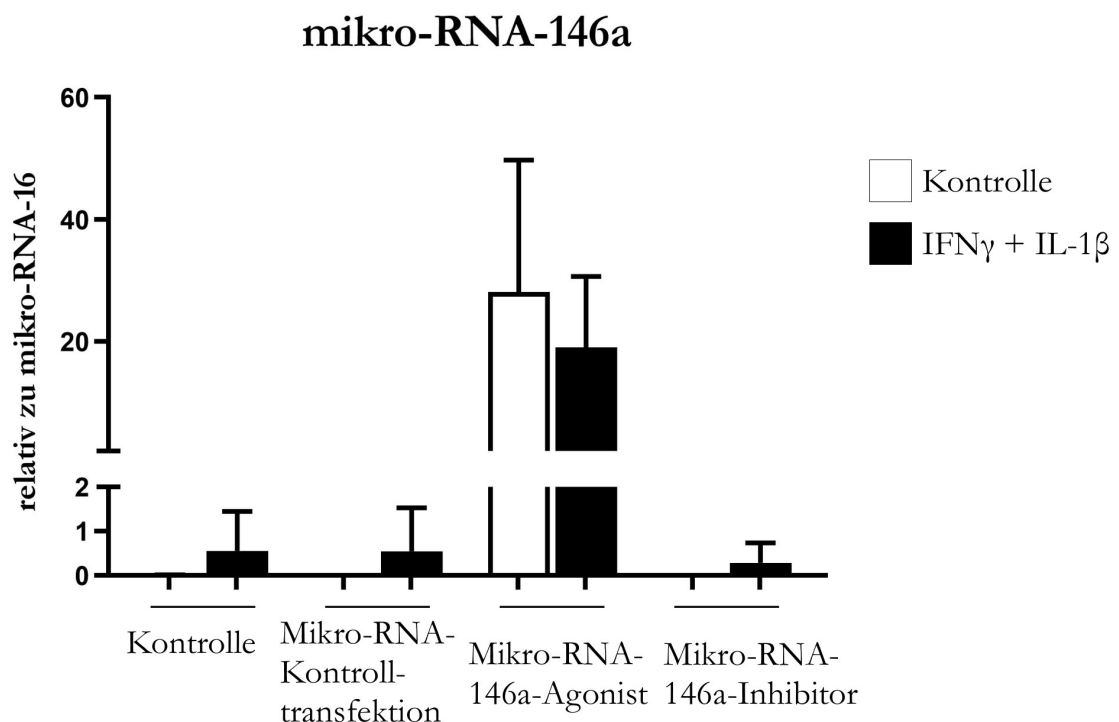


Abbildung 12: Mikro-RNA-PCR der Lipid-Nanopartikel-Transfektionsexperimente

Abgebildet ist die Mikro-RNA-146a-Expression relativ zur endogenen Kontrolle mikro-RNA-16 mit Mittelwerten und Standardabweichungen. Hier wurden alle Wiederholungen nach Bildung der Mittelwerte der einzelnen Versuche zusammengefasst. Die biologische Varianz führte zu hohen Standardabweichungen in der Zusammenfassung. In der Auswertung aller einzelnen Versuche war mikro-RNA-146a durch den Mikro-RNA-146a-Agonist zytokinexponiert und nicht zytokinexponiert signifikant gegenüber allen anderen Gruppen erhöht. Um auch den im Vergleich zur Überexpression geringen Anstieg von mikro-RNA-146a durch die Zytokinexposition darzustellen, wurde die y-Achse geteilt.

3.5.2 Kontrolle der Exposition zu proinflammatorischen Zytokinen

Analog zu den vorherigen Experimenten wurde die Zytokinexposition mit der MHC-I-Färbung der Zellen aller *wells* überprüft. Dabei zeigte sich eine stark erhöhte Expression von MHC-I durch die Zytokinexposition. Im Vergleich aller Versuche gab es zwischen den Gruppen (Kontrolle, Mikro-RNA-Kontrolltransfektion, Mikro-RNA-146a-Agonist und Mikro-RNA-146a-Inhibitor) keine konsistenten Unterschiede (Abbildung 13). Dies bestätigte sich auch in der erneut wie oben beschrieben durchgeführten Graustufenanalyse, die in Abbildung 14 gezeigt ist.

Die Zytokinexposition funktionierte auch bei diesem Transfektionssystem verlässlich, im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen gab es keinen proinflammatorischen Effekt durch die Transfektion selbst.

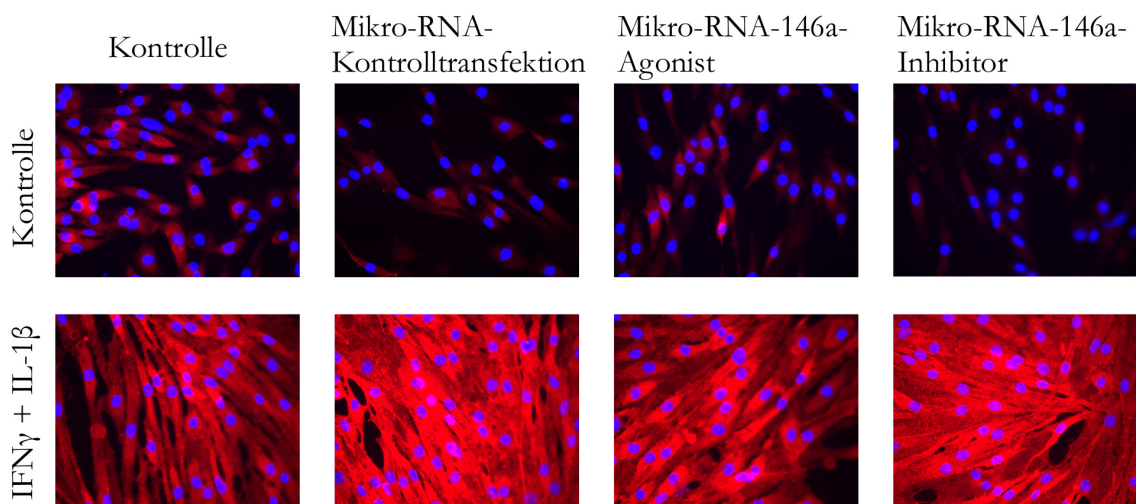


Abbildung 13: MHC-I-Färbung der Lipid-Nanopartikel-Transfektionsexperimente

MHC-I-Immunfluoreszenzfärbung der Zellen der Lipid-Nanopartikel-Transfektionsexperimente, MHC-I erscheint rot, die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI erscheint blau. In der oberen Reihe finden sich die Kontrolle, die Mikro-RNA-Kontrolltransfektion und die Transfektion mit dem Mikro-RNA-146a-Agonist und -Inhibitor jeweils ohne Zytokinexposition (Kontrolle), in der unteren Reihe jeweils mit proinflammatorischer Zytokinexposition ($\text{IFN}\gamma + \text{IL-1}\beta$). Diese führte zu vermehrter MHC-I-Expression, sonst gab es keine relevanten Unterschiede. Es wurden in allen Wiederholungen ausschließlich ähnliche Ergebnisse gesehen, aufgenommen wurde in 40-facher Vergrößerung.

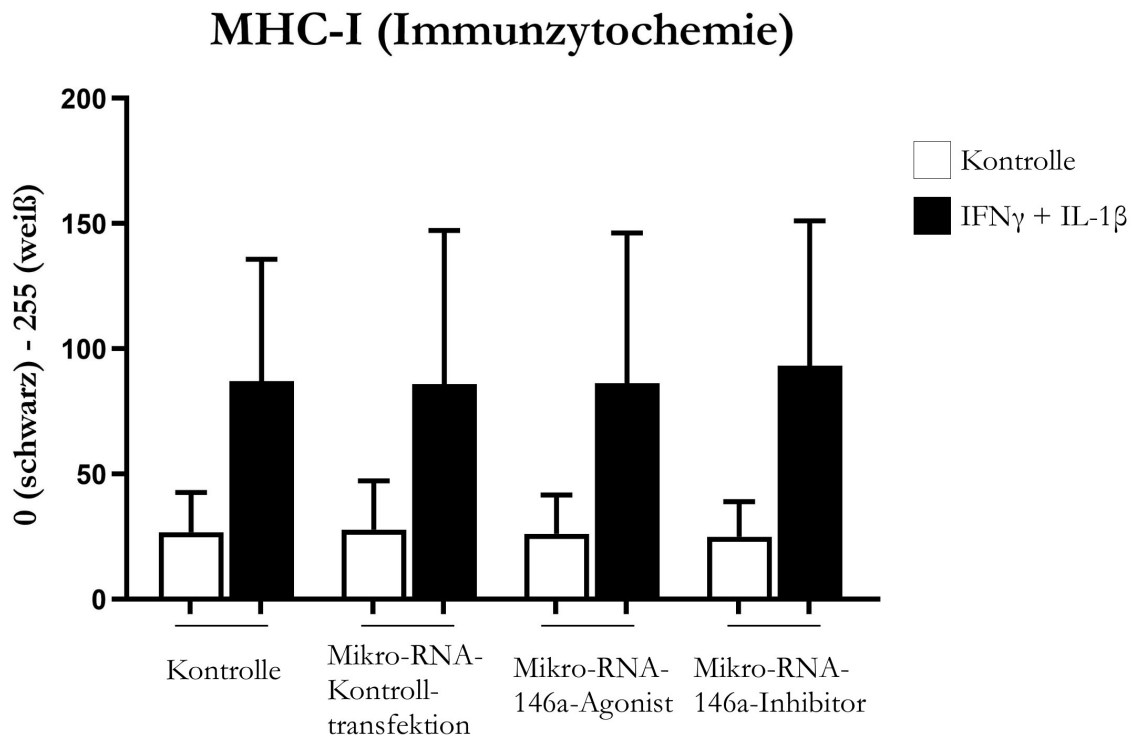


Abbildung 14: Graustufenanalyse der MHC-I-Immunfluoreszenzfärbung der Lipid-Nanopartikel-Transfektionsexperimente

Die Auswertung erfolgte wie für die vorherigen Experimente beschrieben. Abgebildet ist die Zusammenfassung aller Versuche nach Bildung der Mittelwerte der einzelnen Versuche, Darstellung als Balkendiagramm mit Mittelwerten und Standardabweichungen. Aufgrund der Varianz zwischen den unterschiedlichen Primärkulturen und damit den unterschiedlichen Versuchen resultierte in der Zusammenfassung eine hohe Standardabweichung. Für die Auswertung wurden die Versuche einzeln betrachtet, bei zwei Versuchen waren alle zytokinexponierten (IFN γ + IL-1 β) Gruppen gegenüber allen nicht zytokinexponierten Gruppen signifikant erhöht, bei den anderen beiden Versuchen viele der zytokinexponierten Gruppen gegenüber den nicht zytokinexponierten. Abgesehen vom Zytokinexpositionseffekt gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.5.3 Analyse von Zellstressmarkern

So wie in den vorherigen Experimenten wurden Zellstressmarker mittels qPCR analysiert. Auf den Mikro-RNA-146a-Inhibitor wird hier nicht eingegangen, weil er offenbar, wie oben beschrieben, nicht funktionierte (vergleiche 3.5.1).

MHC-I und CXCL9 waren fortwährend unter Zytokinexposition deutlich erhöht. Zudem wurde CXCL9 erst unter Zytokinexposition deutlich exprimiert.

Bei beiden zeigte sich im ersten Experiment die Tendenz zur zusätzlichen Erhöhung durch den Mikro-RNA-146a-Agonist; bei MHC-I mit und ohne Zytokinexposition, bei CXCL9 vor

allem in Kombination mit der Zytokinexposition. Obwohl diese Beobachtung im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen stand, ließ sie sich in den Wiederholungen nicht reproduzieren und erscheint deshalb als Ergebnis fragwürdig. Die einzelnen Wiederholungen sind in Abbildung 15 dargestellt.

iNOS hatte im ersten Versuch in allen Gruppen ein sehr geringes Expressionslevel und stieg durch die Zytokinexposition nicht regelhaft an, daher wurde im zweiten Versuch stattdessen HMGB1 probatorisch untersucht. Auch HMGB1 zeigte keine Ergebnisse, die eine weitere Überprüfung begründet hätten. Beides wurde nicht weiterverfolgt.

MHC-I

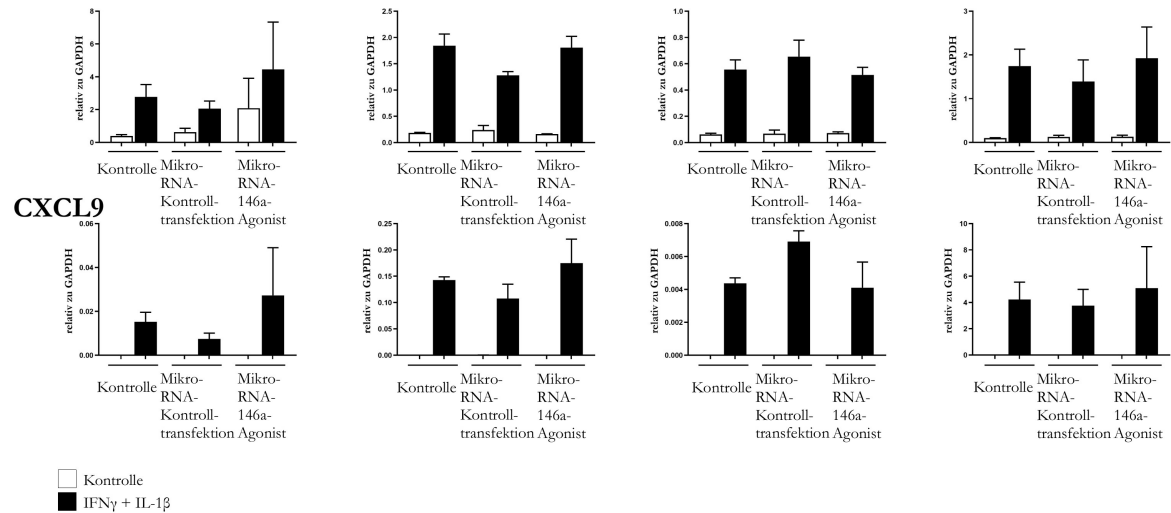


Abbildung 15: Ergebnisse der MHC-I- und CXCL9-PCRs der Lipid-Nanopartikel-Transfektionsexperimente

Abgebildet ist die Expression von MHC-I (obere Reihe) und CXCL9 (untere Reihe) relativ zur endogenen Kontrolle GAPDH in den Gruppen Kontrolle, Mikro-RNA-Kontrolltransfektion und Mikro-RNA-146a-Agonist jeweils nicht zytokinexponiert und zytokinexponiert (IFN γ + IL-1 β) mit Mittelwerten und Standardabweichungen. Die vier Wiederholungen sind einzeln von links nach rechts dargestellt. Deutlich war der Anstieg der Expression beider Marker nach Zytokinexposition zu erkennen, so fand sich in der statistischen Auswertung auch häufig ein signifikanter Unterschied zwischen nicht zytokinexponierten und zytokinexponierten Gruppen. Im ersten Versuch (jeweils erste Grafik von links) zeigte sich tendenziell ein Anstieg der Marker durch die Transfektion mit dem Agonisten, dies ließ sich jedoch nicht reproduzieren. Bei der Gegenüberstellung der einzelnen Versuche wird die biologische Varianz der Primärkulturen in den unterschiedlichen Versuchen anhand der unterschiedlichen Expressionslevel deutlich.

3.5.4 Transfektion durch Lipid-Nanopartikel in CCL-136 Zellen

Auch die Transfektion mithilfe von Lipid-Nanopartikeln wurde bei CCL-136 Zellen getestet. Mit der Mikro-RNA-qPCR konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression von mikro-RNA-146a durch den Agonisten erreicht wird (Abbildung 16).

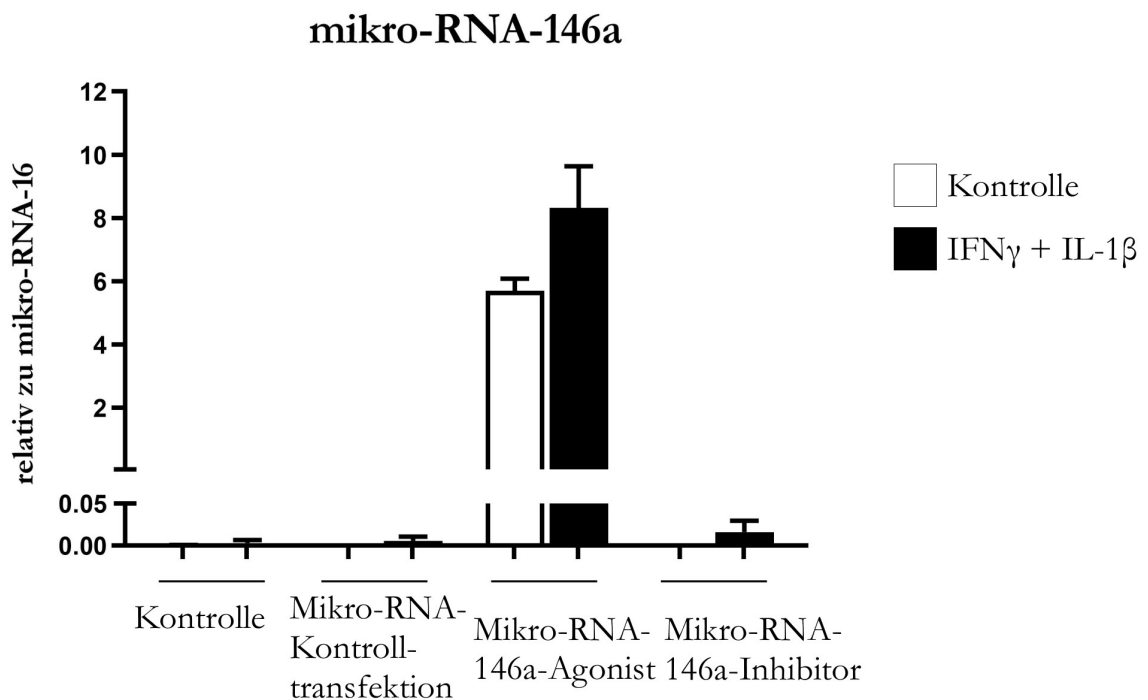


Abbildung 16: Mikro-RNA-PCR der CCL-136 Zellen

Abgebildet ist die Expression von mikro-RNA-146a relativ zu mikro-RNA-16 beim Transfektionsexperiment mit Lipid-Nanopartikeln bei CCL-136-Zellen, angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Der Mikro-RNA-146a-Agonist führte zur Überexpression von mikro-RNA-146a. Ähnlich wie in humanen Myotuben führte die Zytokinexposition ebenfalls zu einem geringen Anstieg von mikro-RNA-146a, zur Darstellung wurde die y-Achse geteilt.

Zur Überprüfung der Zytokinexposition wurde erneut eine MHC-I-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, beispielhaft in Abbildung 17 dargestellt. Die Zytokinexposition funktionierte jedoch nicht so zuverlässig wie in Myotuben, teilweise zeigten Kontrollzellen Zeichen von Zellstress oder zytokinexponierte Zellen keine vermehrte MHC-I-Expression.

Wie in den vorherigen Transfektionsversuchen mit dieser Zelllinie bestand das Problem, dass die Zellen eine kurze Verdopplungszeit haben, aber bei einem zu dichten Bewuchs der *wells* absterben. Die Auswirkungen von Transfektion und Zytokinexposition nach definierten Zeitspannen zu untersuchen, war deshalb nicht ohne weiteres möglich. Es zeigte sich, dass die

Transfektion von CCL-136 Zellen durch Lipid-Nanopartikel möglich ist, der Versuchsablauf dafür jedoch optimiert werden muss. Dies wurde zunächst nicht weiterverfolgt.

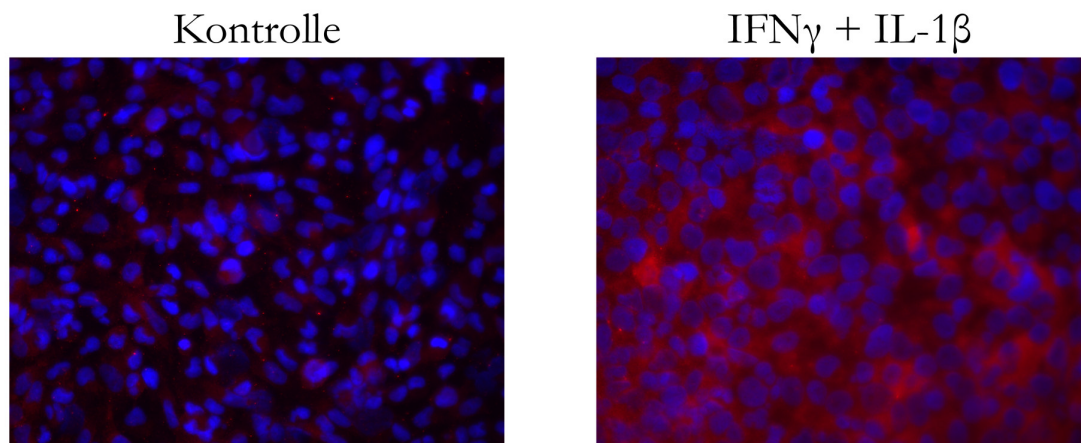


Abbildung 17: MHC-I-Färbung von CCL-136 Zellen

Abgebildet sind CCL-136 Zellen, die im Rahmen der Transfektionen wie für humane Myotuben beschrieben 48 Stunden den Zytokinen exponiert wurden (IFN γ + IL-1 β). Anschließend erfolgte die MHC-I-Immunfluoreszenzfärbung. Hier ist im Vergleich zur Kontrolle eine erfolgreiche Zytokinexposition mit verstärkter MHC-I-Expression abgebildet. MHC-I erscheint rot, die Zellkerne sind mit DAPI blau gegengefärbt, aufgenommen wurde in 40-facher Vergrößerung.

4 Diskussion

Um die Mikro-RNA-Expression und die Wirkungen von mikro-RNA bei der Einschlusskörpermyositis zu untersuchen, wurden unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen wurde die mikro-RNA von unterschiedlichen biologischen Proben sequenziert, zum anderen wurden Mikro-RNA-Transfektionsexperimente durchgeführt.

4.1 Sequenzierungen vom In-vitro-Modell und von den Muskelbiopsien

4.1.1 Vergleich der Ergebnisse der Sequenzierungen

Bei der Sequenzierung der kleinen RNA zeigten sich sowohl bei den Muskelbiopsien als auch beim In-vitro-Modell deutliche Unterschiede zwischen der Einschlusskörpermyositis bzw. der Zytokinexposition und den jeweiligen Kontrollen. Es gab also krankheitsassoziierte Veränderungen im Expressionsmuster der mikro-RNA, wie erwartet wurde.

Im Vergleich von In-vitro-Modell und Biopsien fanden sich viele Übereinstimmungen, erkennbar anhand der vielen gemeinsam hoch- oder herunterregulierten mikro-RNAs und der guten Korrelation der relativen Expressionswerte dieser mikro-RNAs. Zum einen kann daher im Hinblick auf die Mikro-RNA-Expression das In-vitro-Modell der Einschlusskörpermyositis als geeignetes Modell gewertet werden. Da es auf der proinflammatorischen Wirkung der Zytokine beruht, ist so zum anderen zu vermuten, dass bei der IBM die entzündlichen Prozesse mit im Mittelpunkt stehen. Da im In-vitro-Modell reine Myotubenkulturen verwendet wurden, kann außerdem angenommen werden, dass die nachweisbaren Mikro-RNA-Veränderungen in den Biopsien hauptsächlich auf den Muskelzellen beruhen, nicht auf möglicherweise miterfassten geringen Anteilen anderer Zellen.

4.1.2 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien

Bei den Biopsien und im In-vitro-Modell war mikro-RNA-155 die am signifikantesten veränderte mikro-RNA. Sie war im Vergleich mit den Kontrollen hochreguliert. Das bestätigt die Ergebnisse von Eisenberg et al. (2007). Sie untersuchten die Mikro-RNA-Expression bei zehn unterschiedlichen Muskelerkrankungen. Unter anderem wurde die mikro-RNA aus sechs Muskelbiopsien von Patient*innen mit Einschlusskörpermyositis mithilfe eines *arrays* bestimmt. Zu den am stärksten hochregulierten mikro-RNAs gehörten neben mikro-RNA-

155 auch mikro-RNA-146a und b. Das deckt sich mit den Ergebnissen der Sequenzierung in dieser Arbeit. Allerdings fanden Eisenberg et al. (2007) bei allen untersuchten Krankheiten Veränderungen von mikro-RNA-155 und -146b, nicht nur bei den inflammatorischen Myopathien; diese beiden mikro-RNAs waren in unterschiedlichem Ausmaß stets hochreguliert. Möglicherweise sind sie in Signalwege involviert, die bei vielen bekannten Muskel-erkrankungen dysreguliert sind.

So fanden Roberts et al. (2012) in einem Mausmodell der Muskeldystrophie Typ Duchenne mit einem *array* ebenfalls wie in dieser Arbeit eine verstärkte Expression von mikro-RNA-146b und eine verminderte Expression von mikro-RNA-1 und -133 in einigen Muskeln. Greco et al. (2009) brachten die verminderte Expression von mikro-RNA-1 neben der Muskeldystrophie Typ Duchenne generell mit Muskeldegeneration in Verbindung.

Georgantas et al. (2014) untersuchten ebenfalls bei inflammatorischen Myopathien die Mikro-RNA-Expression mit einem *array*. Dabei beobachteten sie neben der Hochregulation von mikro-RNA-146 und -155 die verminderte Expression von mikro-RNA-1 und -133 bei der IBM. Das bestätigt sich in dieser Arbeit. Georgantas et al. (2014) stellten dann zwischen erhöhter Zytokinexpression und herunterregulierter Mikro-RNA-Expression einen Zusammenhang her. TNF α hemmte die Expression von mikro-RNA-1 und -133 und unterdrückte damit die Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben. So könnte die Entzündung bei den inflammatorischen Myopathien zur Muskeldegeneration führen.

Kinder et al. (2020) wiesen in einem Myositis-Mausmodell und an IBM-Biopsien ebenfalls eine Hochregulation von mikro-RNA-146 nach. Das wurde mit einer Muskelschwäche durch reduzierte Dystrophinexpression bei Myositis in Zusammenhang gebracht.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmende Mikro-RNA-Veränderungen beobachteten auch Panguluri et al. (2010). Sie nutzten ein In-vitro-Modell für Skelettmuskelatrophie mit C2C12-Myotuben, die dem Zytokin TWEAK ausgesetzt wurden. Darunter fand sich neben anderem eine verminderte Expression von mikro-RNA-1 und -133 sowie eine verstärkte Expression von mikro-RNA-146a.

Zusammenfassend existieren einige Übereinstimmungen anderer Studien mit dieser Arbeit, die die Aussagekraft und Validität der Ergebnisse stützen. Begrenzt wird die Vergleichbarkeit durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden sowohl für die Mikro-RNA-Detektion als auch hinsichtlich der untersuchten Proben. Darüber hinaus liegen bisher insgesamt wenig Forschungsergebnisse zu Mikro-RNA-Veränderungen bei inflammatorischen Myopathien vor. In dieser Arbeit finden sich erstmals Sequenzierungen der mikro-RNA bei IBM. Die Sequen-

zierung ermöglicht eine umfassende Untersuchung aller bekannten und sogar neuer mikro-RNAs, birgt jedoch bei der sensitiven Erfassung kleinster Veränderungen auch die Gefahr falscher Ergebnisse. So müssten die Veränderungen in einem nächsten Schritt erneut validiert und in einen Kontext mit biologischen Signalwegen gesetzt werden. Dennoch geben die bestehenden Übereinstimmungen mit anderen Ergebnissen einen klaren Hinweis auf die Validität der Ergebnisse in dieser Arbeit.

Es deutet sich, in Übereinstimmung mit den Vermutungen über die Pathogenese, ein Zusammenhang der Mikro-RNA-Veränderungen bei der IBM mit Muskeldegeneration und Entzündung an. Allerdings finden sich ähnliche Veränderungen auch bei anderen Muskelerkrankungen. Die mikro-RNAs sind häufig bei allgemeinen Zellprozessen beteiligt und werden oft gewebetypisch exprimiert. So verwundert es nicht, dass bei verschiedenen Erkrankungen mit einer Dysregulation in Skelettmuskelzellen ähnliche Mikro-RNA-Veränderungen gefunden werden können. Interessant erscheint zum einen die Aufklärung der molekularen Zielmoleküle einzelner mikro-RNAs und damit ihrer genauen Wirkweise im Muskel. Zum anderen scheint ein Vergleich von Sequenzierungen unterschiedlicher Muskelerkrankungen lohnend, um neben gemeinsamen Veränderungen möglicherweise krankheitsspezifische Mikro-RNA-Veränderungen festzustellen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten aus Sequenzierung von entzündlichem In-vitro-Muskelzellkulturmodell und IBM-Muskelbiopsien bilden die Grundlage für weitergehende Untersuchungen.

4.1.3 Ausgewählte Mikro-RNA-Veränderungen

Auf einige Mikro-RNA-Veränderungen soll im Folgenden gesondert eingegangen werden, da sie aufgrund des häufigen Auftretens und ihrer bisher bekannten Funktionen von besonderem Interesse erscheinen.

4.1.3.1 Mikro-RNA-1 und -133

Mikro-RNA-1 und -133 waren in dieser Arbeit im In-vitro-Modell und in den IBM-Biopsien herunterreguliert. Bei ersterer mikro-RNA fand sich in den unterschiedlichen Proben die Form mikro-RNA-1-3p signifikant herunterreguliert, bei letzterer die Formen mikro-RNA-133a-3p, -133a-5p und -133b. Bei beiden Mikro-RNA-Familien handelt es sich um muskelspezifische *myomiRs*, die jeweils in komplexe Regulationsnetzwerke in der Skelettmuskelzelle eingebunden sind. Während mikro-RNA-1 insbesondere die Myoblastendifferenzierung fördert, scheint mikro-RNA-133 die Myoblastenproliferation zu unterstützen (Townley-Tilson et al. 2010; Horak et al. 2016). Jedoch werden trotz verschiedener Funktionen beide in einigen

Genclustern gemeinsam exprimiert. Sie werden über muskelspezifische Transkriptionsfaktoren reguliert und können diese wiederum hemmen. Bei Skelett- und Herzmuskelerkrankungen wurden bereits Veränderungen dieser mikro-RNAs nachgewiesen (Townley-Tilson et al. 2010). Bei der Einschlusskörpermyositis könnte ihre verminderte Expression für eine Störung der Muskelzellregeneration auf Ebene der Genexpressionsregulation sprechen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch die gemeinsame Betrachtung von mikro-RNAs und Transkriptionsfaktoren im Muskel bei der IBM.

4.1.3.2 Mikro-RNA-146

Bei den IBM-Biopsien und im In-vitro-Modell waren mikro-RNA-146a-5p, -146b-3p und -146b-5p signifikant hochreguliert. Besonders mikro-RNA-146a, gelegentlich auch mikro-RNA-146b, scheinen bei einer Vielzahl an Erkrankungen funktionell relevant verändert. Mikro-RNA-146a wirkt als negativer Regulator des Immunsystems und spielt damit bei Autoimmun- und entzündlichen Krankheiten eine Rolle. Auch bei unterschiedlichen Krebserkrankungen zeigen sich Veränderungen dieser mikro-RNA (Comer et al. 2014; Saba et al. 2014; Testa et al. 2017). Mikro-RNA-146a wird unter anderem durch die NF- κ B-Familie von Transkriptionsfaktoren induziert. Diese Transkriptionsfaktoren können durch unterschiedliche Stimuli, wie beispielsweise Zytokine, im Rahmen von Immunantwort und Entzündungsantwort aktiviert werden (Taganov et al. 2006; Mechtler et al. 2015). Mikro-RNA-146a wiederum kann daraufhin antiinflammatorisch und bei der Feinmodulation der Immunantwort wirken, zum Beispiel hemmt sie IRAK1 und TRAF6, beides Proteine, die in der proinflammatorischen Signalkaskade wichtig sind (Saba et al. 2014; Testa et al. 2017). Möglicherweise wird die Mikro-RNA-146-Familie bei der Einschlusskörpermyositis aufgrund des proinflammatorischen Milieus im Muskel verstärkt exprimiert. Diese Hochregulation könnte einen Versuch der Gegenregulation und Modulation der Entzündungsreaktion darstellen. Auch hier scheint die Untersuchung der molekularen Aktivierungs- und Wirkungswege von mikro-RNA-146a bei der IBM lohnend.

4.1.3.3 Mikro-RNA-155

Mikro-RNA-155-5p war in dieser Arbeit bei den IBM-Biopsien und im In-vitro-Modell die am signifikantesten veränderte mikro-RNA, stets hochreguliert. Diese mikro-RNA gehört zu den meistuntersuchten mikro-RNAs, da sie in vielen Geweben exprimiert wird, viele verschiedene Zellfunktionen beeinflusst und dementsprechend auch bei einer Vielzahl an Krankheiten verändert ist (Liu et al. 2015; Mahesh und Biswas 2019). Dazu zählen beispielsweise Arterio-

sklerose, Rheumatoide Arthritis und gastrointestinale Erkrankungen, allgemeiner auch Krebserkrankungen und entzündliche Krankheiten (Wan et al. 2016; Su et al. 2017; Zheng et al. 2017). Bezogen auf die inflammatorischen Myopathien ist vor allem die Funktion von mikro-RNA-155 im Immunsystem interessant. Ähnlich wie mikro-RNA-146 kann mikro-RNA-155 unter anderem durch viele proinflammatorische Stimuli induziert werden. Die Wirkungen von mikro-RNA-155 sind unterschiedlich, zum Beispiel ist mikro-RNA-155 bedeutsam für die Funktion vieler Immunzellen, eine ausgewogene Immunantwort und kann proinflammatorische Effekte haben (Liu et al. 2015; Bala et al. 2016; Testa et al. 2017; Mahesh und Biswas 2019; Park et al. 2019). Sie kann jedoch beispielsweise auch die Muskelregeneration fördern, indem sie die unterschiedlichen Populationen von Makrophagen reguliert (Nie et al. 2016). Mikro-RNA-155 ist bei der Einschlusskörpermyositis also verstärkt exprimiert; über ihre Auswirkungen und Funktionen ist ohne weitere Untersuchungen derzeit keine klare Aussage möglich. Die starke Expression von mikro-RNA-155 bei der IBM könnte ein Hinweis auf eine entzündliche oder autoimmune Genese sein, allerdings auch aus einem Prozess im späteren Krankheitsgeschehen resultieren.

4.1.4 Ausblick zu den Muskelproben

Neben den angesprochenen Mikro-RNA-Veränderungen könnten im Kontext der Einschlusskörpermyositis auch andere bedeutend sein. Um aus den ausführlichen Daten der Sequenzierungen der kleinen RNA von Biopsien und In-vitro-Modell wichtige mikro-RNAs zu identifizieren, kann eine Korrelation zu bereits bestehenden mRNA-Daten aus dem In-vitro-Modell angestrebt werden. Zusätzlich kann eine Sequenzierung der gesamten RNA der Biopsien inklusive mRNA hilfreich sein. Korrelationen zwischen mikro-RNAs und mRNAs ermöglichen es, die funktionelle Relevanz einzelner Ergebnisse aufzudecken und einen Einblick in die betroffenen Signalwege zu geben. Darüber hinaus stehen weitere Proben aus dem In-vitro-Modell mit längerer Zytokinexpositionsdauer und Proteinproben bereit, um den zeitlichen Verlauf der Mikro-RNA-Veränderungen zu untersuchen. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen das Expressionsmuster von mikro-RNA bei der IBM und bilden damit eine Grundlage für weitergehende Untersuchungen und Fragestellungen.

4.2 Sequenzierung der Blutproben

4.2.1 Ergebnisse der Sequenzierung der Blutproben

Die Ergebnisse der Sequenzierung der kleinen RNA wiesen für die Einschlusskörpermyositis deutliche Veränderungen im Mikro-RNA-Expressionsmuster im Blut nach. Mikro-RNAs werden nicht nur intrazellulär im Gewebe, sondern auch in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten gefunden, zum Beispiel in Leukozyten, Plasma, Serum oder Vollblut. Sie können beispielsweise in sezernierten Exosomen oder mithilfe von Lipoproteinen auch extrazellulär transportiert werden (El-Mogy et al. 2018). Hier wurde die Sequenzierung kleiner RNA an Vollblutproben von IBM-Patient*innen im Vergleich zu Proben weder myopathisch noch inflammatorisch erkrankter Kontrollproband*innen durchgeführt. Dabei konnte jedoch nicht zwischen intra- und extrazellulärer mikro-RNA unterschieden werden, da zelluläre Blutbestandteile und Serum nicht getrennt untersucht wurden. Der Ursprung der nachgewiesenen Veränderungen im Mikro-RNA-Expressionsmuster könnte sowohl in der Sekretion aus Muskelzellen als auch in Immunzellen oder anderen Zellen begründet sein.

Aufgrund der biologischen Verschiedenheit der Blutproben von den anderen sequenzierten Proben überrascht es nicht, dass die Ergebnisse neben einigen Überschneidungen viele Unterschiede aufwiesen. Von den mikro-RNAs, die bei den Muskelproben besonders interessant waren (vergleiche 4.1.3), fanden sich unter den differentiell exprimierten mikro-RNAs der Blutproben lediglich mikro-RNA-146b-3p und -5p wieder. Diese waren im Blut herunterreguliert, anders als in den Muskelproben. Entgegengesetzte Mikro-RNA-Veränderungen zwischen Blut und Muskel wurden zum Beispiel bei der Muskeldystrophie Typ Duchenne bereits für mikro-RNA-1 beobachtet (Zaharieva et al. 2013). Solche Unterschiede zwischen Gewebe und Blut könnten für die gezielte Regulation von extrazellulärer mikro-RNA anstatt eines bloßen Übertretens aus den Zellen sprechen.

Welche einzelnen Veränderungen in den hier untersuchten Blutproben bei der IBM besonders relevant sind, bleibt zunächst spekulativ. Hinweise könnten zum Beispiel Vergleiche mit anderen Myositiden, sowie anderen entzündlichen oder degenerativen Erkrankungen liefern. Ebenso wären Kenntnisse über die Wirkweise der einzelnen mikro-RNAs bei der IBM hilfreich. Aufgrund der dargestellten Ergebnisse scheint ein Blick auf die mikro-RNAs interessant, die in Blutproben, Biopsien und In-vitro-Modell gemeinsam verändert waren. Mikro-RNA-92b-5p war als einzige mikro-RNA in allen drei Gruppen hochreguliert. Veränderungen von mikro-RNA-92b wurden bislang häufig im Zusammenhang mit Krebserkrankungen beobachtet. Außerdem konnte bei C2C12-Myoblasten eine Hemmung der Prolife-

ration und Migration durch mikro-RNA-92b-3p gezeigt werden (Ye et al. 2020). Ähnliches könnte bei der IBM eine Rolle spielen. Gemeinsam herunterreguliert waren in Blutproben und Muskelproben zwei mikro-RNAs: mikro-RNA-30a-5p und mikro-RNA-181a-2-3p. Unter einer Vielzahl an Funktionen wurde die Mikro-RNA-30-Familie auch mit Muskelentwicklung in Verbindung gebracht. Zhang et al. (2016) beschrieben eine Hemmung der Muskelzellendifferenzierung, während Guess et al. (2015) eine Förderung der Myoblastendifferenzierung sowie eine Korrelation zwischen Muskeldegeneration und verminderter Mikro-RNA-30-Expression zeigten. Trotz bestehender Unsicherheiten bezüglich der exakten Funktionen und Ziele der einzelnen Mikro-RNA-30-Formen gibt es offenbar einen Einfluss dieser mikro-RNA auf Muskelzellen. So erscheint eine verminderte Expression bei der IBM passend und kann eine Fragestellung weiterer Untersuchungen sein. Mikro-RNA-181 wurde neben anderen Funktionen ebenfalls mit der Muskeldifferenzierung in einen Zusammenhang gebracht. Sie soll während Differenzierung und Regeneration verstärkt exprimiert werden und diese fördern (Naguibneva et al. 2006). Eine verminderte Expression bei der IBM kann möglicherweise eine Störung der Regeneration bedeuten. Die Assoziation der gemeinsamen Mikro-RNA-Veränderungen von Blutproben und Muskelproben der IBM mit der Muskelhomöostase deuten darauf hin, dass viele der einzelnen nachgewiesenen Veränderungen bei der Erkrankung von Relevanz sein könnten. Zur eindeutigen Beurteilung müssen jedoch weitere Untersuchungen folgen.

4.2.2 Vergleich der Ergebnisse der Blutproben mit anderen Studien

Einzelne mikro-RNAs oder Kombinationen mehrerer mikro-RNAs sind bei krankheitsspezifischen Veränderungen vielversprechende Kandidaten für neue Biomarker (Gilad et al. 2008; Backes et al. 2016). Das gilt auch für Muskelerkrankungen. Zum Beispiel konnten Hirai et al. (2018) Mikro-RNA-Veränderungen im Plasma von Patient*innen mit Dermato- und Polymyositis vor und nach immunsuppressiver Therapie feststellen. Israeli et al. (2016) zeigten an Mausmodellen für Muskeldystrophien veränderte mikro-RNAs im Serum und eine Verminderung dieser Veränderungen durch eine Therapie.

Für die Einschlusskörpermyositis finden sich bislang wenig Forschungsergebnisse. Parkes et al. (2020) sequenzierten unter anderem die mikro-RNA aus Vollblutproben von fünf IBM-Patient*innen. Darin fanden sie sieben differentiell exprimierte mikro-RNAs, allerdings bei nicht für multiples Testen korrigiertem Signifikanzniveau $p \leq 0,01$. Mit Korrektur erreichte keine mikro-RNA eine Signifikanz, was möglicherweise durch eine kleine Fallzahl bedingt war. Nur zwei der sieben von Parkes et al. (2020) nachgewiesenen mikro-RNAs fanden sich auch in

den Ergebnissen der Sequenzierung dieser Arbeit: mikro-RNA-10a-5p (herunterreguliert) und mikro-RNA-92a-1-5p (hochreguliert). Mikro-RNA-10a-5p war in dieser Arbeit die am signifikantesten veränderte mikro-RNA. Sie wird zum Beispiel auch bei juveniler Dermatomyositis vermindert exprimiert (Xu et al. 2016). Weiterhin wurden in dieser Arbeit im Vergleich zur Studie von Parkes et al. (2020) mit 169 deutlich mehr differentiell exprimierte mikro-RNAs im Blut von IBM-Patient*innen nachgewiesen. Insofern scheinen die Ergebnisse zunächst wenig übereinstimmend zu sein. Mögliche Erklärungen sind Unterschiede in der angewandten Methodik, sodass beides gegebenenfalls nicht ohne weiteres verglichen werden kann, oder geringe Anzahlen an Proben.

Zusätzlich sollte beachtet werden, dass die sehr sensitive Methode der Sequenzierung auch fehlerhafte Ergebnisse haben kann, wie im vorherigen Abschnitt dargestellt. Eine wiederholte Validierung der Ergebnisse scheint sinnvoll. Insbesondere bei mikro-RNAs als mögliche Biomarker können erst in der Zusammenschau vieler Ergebnisse verlässliche Aussagen getroffen werden (Backes et al. 2016), bisher fehlen dafür aber weitere Studien.

4.2.3 Ausblick zu den Blutproben

Letztlich ergeben sich aus den nachgewiesenen Veränderungen von mikro-RNA im Blut bei der Einschlusskörpermyositis eine Reihe weiterer Fragestellungen. In erster Linie ist die Frage nach verlässlichen Biomarkern der Erkrankung interessant. Dazu würden Analysen zur Sensitivität und Spezifität einzelner mikro-RNAs oder Mikro-RNA-Profile in der Erkennung und Abgrenzung gegenüber dem Gesunden und anderen Krankheiten weiterhelfen. Die bereits erhobenen Daten bilden hierfür eine Grundlage. Zusätzlich würden Blutproben anderer Erkrankungen (Dermatomyositis, Antisynthetase-Syndrom, Chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie und Myotone Dystrophie Typ 1) für weitere Untersuchungen bereitstehen. Folgeuntersuchungen könnten auch beleuchten, ob und welche Veränderungen einzigartig bei der IBM sind. Ebenso interessant wäre, ob die Gemeinsamkeiten oder die Unterschiede zwischen Blut- und Muskelbiopsieproben relevant sind. Im Detail bleibt das bei den vielen bereits bekannten und vielen noch unbekanntem Funktionen der einzelnen veränderten mikro-RNAs derzeit noch offen.

4.3 Transfektionsexperimente

4.3.1 Ergebnisse der Transfektionsexperimente

Neben den Sequenzierungen der unterschiedlichen Proben wurden erste Transfektionsexperimente im Zellkulturmodell durchgeführt, um den Einfluss einzelner mikro-RNAs zu untersuchen. Die im Modell genutzte proinflammatorische Zytokinexposition führte dabei stets zu erhöhtem Zellstress. Unter dieser Zytokinexposition, also im entzündlichen Milieu, wurden in der Mikro-RNA-qPCR stets ein Anstieg von mikro-RNA-146a und ein Abfall von mikro-RNA-133b beobachtet. Das validiert die Ergebnisse der Sequenzierungen von den Muskelproben.

Mit einem Plasmid wurde die Überexpression von mikro-RNA-133b herbeigeführt. Die Überexpression konnte allerdings nicht verlässlich erreicht werden, sodass keine eindeutigen Ergebnisse zur Wirkung der mikro-RNA in diesem Modell erzielt wurden. Dazu könnten weitere Experimente mit veränderter Methodik Aufschluss geben. Es ist davon auszugehen, dass mikro-RNA-133 auf die Proliferation und Differenzierung von Muskelzellen Einfluss nimmt und diese verändern kann (Georgantas et al. 2014). Ob auch die Zellstressantwort der Muskelzellen beeinflusst wird, bleibt fraglich.

Außerdem wurde mikro-RNA-146a untersucht. Zunächst wurde sie mit einem Plasmid erfolgreich überexprimiert. Bei einem Zellstressmarker, MHC-I, zeigte sich unter Zytokinexposition und Mikro-RNA-146a-Überexpression ein Anstieg in den Myotuben. In den folgenden Versuchen wurde mikro-RNA-146a mithilfe von Lipid-Nanopartikeln erfolgreich überexprimiert. Hier zeigten die analysierten Zellstressparameter, MHC-I und CXCL9, insbesondere in Kombination mit der Zytokinexposition in der ersten Wiederholung ebenfalls die Tendenz eines Anstiegs. Das ließ sich jedoch in den anderen Wiederholungen nicht reproduzieren und war dementsprechend nicht signifikant in der Zusammenfassung dieser Versuche. Mithilfe von Lipid-Nanopartikeln wurde zusätzlich eine Inhibition von mikro-RNA-146a versucht. Das war nicht verlässlich möglich, sodass daraus keine sicheren Ergebnisse abgeleitet werden konnten. Damit bleibt auch der Einfluss von mikro-RNA-146a auf die Zellstressantwort der Muskelzellen unsicher. Eine Förderung des Zellstress deutete sich an, konnte jedoch nicht sicher belegt werden. Zudem gilt mikro-RNA-146a bisher als negativer Regulator der Immunantwort und hat meist feinmodulatorische und antiinflammatorische Effekte (vergleiche 1.2.5 und 4.1.3.2). Zusätzlich konnten Sun et al. (2017) zum Beispiel zeigen, dass die Überexpression von mikro-RNA-146 im Mausmodell und in C2C12-Muskelzellen eine zytokininduzierte Muskelfibrose hemmen kann. Erwartet wurde in dem hier

angewandten Modell daher eine negative Auswirkung auf den Zellstress; eine Förderung des Zellstresses ist zwar ebenso möglich, muss jedoch kritisch geprüft werden. Weitere Versuche sind deshalb erforderlich.

4.3.2 Methodik der Transfektionsexperimente

Bei den für die Transfektionsexperimente verwendeten Methoden gilt es einige Punkte zu beachten und für die Bewertung der dargestellten Ergebnisse mit einzubeziehen. Als Zellkulturen wurden in erster Linie humane Myotuben genutzt. Diese Primärkulturen bieten gegenüber Zellkulturen der Rhabdomyosarkomazelllinie CCL-136 oder der immortalisierten Mausmyoblastenzelllinie C2C12 den Vorteil, als In-vitro-Modell den In-vivo-Vorgängen näher zu entsprechen und damit möglicherweise validere Ergebnisse zu liefern.

Der Nachteil der Primärkulturen liegt in der großen biologischen Varianz zwischen den einzelnen Kulturen sowie der schwierigeren Verfügbarkeit und Transfizierbarkeit (Campeau et al. 2001; Hamm et al. 2002). Die biologische Varianz in den unterschiedlichen Wiederholungen lässt bei gemeinsamer Betrachtung häufig weniger statistisch signifikante Effekte zu. Aufgrund der schwierigeren Verfügbarkeit wurden für die Transfektionsexperimente humane Myotubenkulturen sowohl des etablierten In-vitro-Modells als auch aus alternativem Muskelursprung verwendet, siehe 2.3.1. Diese könnten Unterschiede aufweisen; dabei ergab sich bezüglich der hier untersuchten Fragestellungen allerdings kein Anhalt für solche Unterschiede, sodass die Ergebnisse gemeinsam betrachtet wurden. Dass die Transfektion mit Plasmiden und Lipid-Nanopartikeln möglich war, ist als Erfolg zu werten. Es könnte unter anderem mit den Eigenschaften von Primärkulturen zusammenhängen, dass die Transfektion nicht immer verlässlich funktionierte. Für Folgeuntersuchungen könnten auch CCL-136 Zellen mit optimiertem Protokoll eingesetzt werden (vergleiche 3.5.4).

Das erste Transfektionssystem mit Plasmiden und Lipofectamine zeigte einen leichten proinflammatorischen und zelltoxischen Effekt. Dabei war die Transfektionsrate trotz Visualisierung durch GFP nicht sicher bestimmbar und lag wahrscheinlich niedriger als die erwünschten 80 – 90 %.

Aufgrund dieser Einschränkungen bei der Plasmidtransfektion wurde ein zweites Transfektionssystem mit Lipid-Nanopartikeln eingesetzt. Ein Vorteil dieses Systems ist, dass jedes synthetische Oligonukleotid transfiziert werden kann und diese leicht verfügbar sind. Die hier verwendeten Oligonukleotide hatten wenig Effekte, was aber an der Auswahl der analysierten Ziele liegen kann. Auch vorteilhaft war, dass dieses System keine eigenen Auswirkungen auf die Zellen hatte. Anhand der Überprüfung mit der Mikro-RNA-qPCR war von erfolgreicher

Transfektion auszugehen. Die Transfektionsrate konnte jedoch nicht bestimmt werden. Insgesamt schienen die Lipid-Nanopartikel den Plasmiden überlegen. Für Folgeuntersuchungen wäre eine nachweisbar hohe Transfektionsrate, gegebenenfalls mit einem weiteren Transfektionssystem, erstrebenswert.

Im hier verwendeten Zellkulturmodell übte die proinflammatorische Zytokinexposition einen deutlichen und großen Effekt aus. Mikro-RNAs haben meist kleinere Effekte und bewirken oft eine Feinmodulation der Genexpression (Mott und Mohr 2015). Solche kleinen Effekte im Vergleich mit den großen Effekten der Zytokinexposition nachzuweisen, birgt Schwierigkeiten. Möglicherweise kann die Analyse direkter Zielmoleküle der mikro-RNAs anstatt der Betrachtung allgemeinerer Auswirkungen wie der Zellstressantwort hilfreich sein. Zudem wurden die mikro-RNAs durch Transfektion teils über physiologische Level hinaus überexprimiert (siehe 3.5.1), sodass dabei möglicherweise nicht ihre Funktion in-vivo abgebildet werden kann.

Wegen der dargestellten Beschränkungen bei der Methodik der Transfektionsexperimente in dieser Arbeit sind die Ergebnisse dieser Versuche nicht uneingeschränkt verlässlich. Sie können eher einen Hinweis auf den Einfluss von einzelnen mikro-RNAs geben, der in weiteren Versuchen mit zusätzlichen Methoden belegt werden müsste, beispielsweise mit *Luciferase-Assays* zum Nachweis eines direkten Mikro-RNA-Zielmoleküls.

4.3.3 Ausblick zu den Transfektionsexperimenten

Transfektionsexperimente zur genauen Untersuchung einzelner mikro-RNAs und ihrer Funktion bei der Einschlusskörpermyositis sind möglich und sinnvoll. Erste Versuche erbrachten zwar keine eindeutigen Ergebnisse, bekräftigten jedoch die Aussicht auf Erkenntnisse durch Wiederholungen und Folgeuntersuchungen. Daher sollen weitere funktionelle Experimente folgen. Dabei könnten weiterhin mikro-RNA-133 und -146, oder andere mikro-RNAs aus den Sequenzierergebnissen betrachtet werden, wie beispielsweise in 4.1.2 angesprochen. Möglicherweise ist eine Kombination von Inhibition oder Überexpression mehrerer mikro-RNAs für deutlichere Ergebnisse sinnvoll. Auch eine Anpassung der analysierten Zielparameter ist aussichtsreich, um im In-vitro-Modell den Zellstress umfassender zu beurteilen oder bekannte Zielproteine der entsprechenden mikro-RNA in Muskelzellen zu validieren. Ein Beispiel wären IRAK1 und TRAF6 als Zielmoleküle von mikro-RNA-146a (Testa et al. 2017) oder der Fokus auf Muskelzellentwicklung bei mikro-RNA-133 (Horak et al. 2016). Versuchsweise könnte ebenso der Zeitpunkt der Transfektion

verändert werden, der bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nach der Muskelzelldifferenzierung und vor der Zytokinexposition lag.

4.4 Mikro-RNA-Expressionsmuster bei der Einschlusskörpermyositis

Ziel dieser Arbeit war es, das Mikro-RNA-Expressionsmuster bei der Einschlusskörpermyositis zu charakterisieren und den Einfluss von mikro-RNA auf die Krankheit zu untersuchen. In den Sequenzierungen der Muskelproben (Biopsien und Zellkulturmodell) und der Blutproben von IBM-Patient*innen wurde eine Vielzahl an Mikro-RNA-Veränderungen nachgewiesen, sodass von einem Einfluss der mikro-RNAs auf mehrere Aspekte der Erkrankung auszugehen ist. Im Zellkulturmodell wurde die Möglichkeit der Transfektion einzelner mikro-RNAs belegt.

Die Ergebnisse leisten einen Beitrag zur Charakterisierung und führen gleichzeitig zu diversen weiteren Fragestellungen. Besonders lohnend wäre der Vergleich mit anderen entzündlich-degenerativen Erkrankungen. Dabei könnten einzigartige Veränderungen bei der IBM oder Gemeinsamkeiten, die beispielsweise in einer ähnlichen Pathogenese begründet sein können, aufgedeckt werden. Ebenso interessant erscheint eine weitere Evaluation der mikro-RNAs im Blut als Biomarker, die unter Umständen eine frühere Diagnosestellung ermöglichen würden. Auch eine Betrachtung der beeinflussten Signalwege durch weitere funktionelle Experimente erscheint gewinnbringend. Daraus folgend würden sich möglicherweise Mikro-RNA-Therapieoptionen ergeben (Parkes et al. 2015), aktuell gibt es bereits erste klinische Studien zu solchen Therapeutika in anderen Bereichen der Medizin (Rupaimoole und Slack 2017). Überdies bleibt die Hoffnung, durch Mikro-RNA-Untersuchungen die umstrittene Pathogenese der IBM aufzuklären.

Um diese Fragestellungen zu beantworten, bieten die Ergebnisse eine Grundlage, die allerdings um weitere Studien, funktionelle Experimente und bioinformatische Analysen erweitert werden muss.

5 Zusammenfassung

Die chronische Erkrankung Einschlusskörpermyositis gehört zu den inflammatorischen Myopathien und ist die häufigste im höheren Lebensalter. Durch Muskelschwäche und -atrophie wird die Lebensqualität der Patient*innen beeinträchtigt. Die Diagnose kann anhand klinischer Parameter und einer Muskelbiopsie gestellt werden. Bislang gibt es keine kurative Therapie. Die Pathogenese ist ungeklärt, vor allem entzündlich-autoimmune und degenerative Prozesse werden diskutiert. Mikro-RNAs, als kleine nicht-kodierende RNAs, beeinflussen hauptsächlich die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen. Damit eröffnen mikro-RNAs im Bereich von Pathogenese, Diagnostik und Therapie neue Möglichkeiten in der Medizin. In dieser Arbeit wurde die Mikro-RNA-Expression bei der Einschlusskörpermyositis mit unterschiedlichen Ansätzen untersucht.

Dazu erfolgten Sequenzierungen der kleinen RNA von einem In-vitro-Modell mit humanen Myotuben unter proinflammatorischer Zytokinexposition, von Muskelbiopsieproben und von Blutproben der Einschlusskörpermyositis. Bei allen Proben wurde eine Vielzahl an Mikro-RNA-Veränderungen nachgewiesen. Die Blutproben zeigten einige Unterschiede zu den Muskelproben aus In-vitro-Modell und Biopsien, die viele Gemeinsamkeiten aufwiesen. In den Muskelproben fiel besonders die verstärkte Expression von mikro-RNA-146 und -155 sowie die verminderte Expression von mikro-RNA-1 und -133 auf.

Weiterhin wurden im selben In-vitro-Modell Transfektionsexperimente mit mikro-RNA-133b und -146a durchgeführt. Dafür wurde ein Transfektionssystem mit Plasmiden und Lipofectamine sowie eines mit Lipid-Nanopartikeln genutzt. Es konnten keine sicheren Ergebnisse über den Einfluss der beiden mikro-RNAs auf die Antwort der Muskelzellen auf die Zytokinexposition gefunden werden. Es wurde allerdings demonstriert, dass funktionelle Experimente zu mikro-RNAs bei der Einschlusskörpermyositis im Zellkulturmodell möglich und sinnvoll sind.

Insgesamt konnte ein Einfluss von mikro-RNA bei der Einschlusskörpermyositis verdeutlicht und ein Beitrag zur Charakterisierung der Mikro-RNA-Veränderungen bei der Erkrankung geleistet werden. Daraus ergeben sich einige vielversprechende Fragestellungen zur weiteren Forschung auf diesem Gebiet, für die diese Arbeit eine Grundlage und eine Datenbasis schafft.

6 Literaturverzeichnis

- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, et al. (2003): A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9, 277–279
- Ashton C, Paramalingam S, Stevenson B, Bruschi A, Needham M (2021): Idiopathic inflammatory myopathies: a review. *Intern Med J* 51, 845–852
- Askanas V, Engel WK (2008): Inclusion-body myositis: muscle-fiber molecular pathology and possible pathogenic significance of its similarity to Alzheimer's and Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 116, 583–595
- Askanas V, Engel WK (2011): Sporadic inclusion-body myositis: Conformational multifactorial ageing-related degenerative muscle disease associated with proteasomal and lysosomal inhibition, endoplasmic reticulum stress, and accumulation of amyloid- β 42 oligomers and phosphorylated tau. *Presse Med* 40, e219–e235
- Askanas V, Engel WK, Nogalska A (2012): Pathogenic Considerations in Sporadic Inclusion-Body Myositis, a Degenerative Muscle Disease Associated With Aging and Abnormalities of Myoproteostasis. *J Neuropathol Exp Neurol* 71, 680–693
- Backes C, Meese E, Keller A (2016): Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Mol Diagn Ther* 20, 509–518
- Badrising UA, Maat-Schieman M, Duinen SG van, Breedveld F, Doorn P van, Engelen B van, Hoogen F van den, Hoogendijk J, Höweler C, Jager A de, et al. (2000): Epidemiology of inclusion body myositis in the Netherlands: A nationwide study. *Neurology* 55, 1385–1388
- Badrising UA, Schreuder GMT, Giphart MJ, Geleijns K, Verschuuren JJGM, Wintzen AR, Group the DIS (2004): Associations with autoimmune disorders and HLA class I and II antigens in inclusion body myositis. *Neurology* 63, 2396–2398
- Bala S, Csak T, Saha B, Zatsiorsky J, Kodys K, Catalano D, Szabo G (2016): The pro-inflammatory effects of miR-155 promote liver fibrosis and alcohol-induced steatohepatitis. *J Hepatol* 64, 1378–1387
- Bartel DP (2004): MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297
- Benveniste O, Stenzel W, Hilton-Jones D, Sandri M, Boyer O, van Engelen BGM (2015): Amyloid deposits and inflammatory infiltrates in sporadic inclusion body myositis: the inflammatory egg comes before the degenerative chicken. *Acta Neuropathol* 129, 611–624

- Budak H, Bulut R, Kantar M, Alptekin B (2016): MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription. *Brief Funct Genomics* 15, 65–71
- Campeau P, Chapdelaine P, Seigneurin-Venin S, Massie B, Tremblay JP (2001): Transfection of large plasmids in primary human myoblasts. *Gene Ther* 8, 1387–1394
- Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G (2016): MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci* 17, 1712
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ (2006): The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38, 228–233
- Comer BS, Camoretti-Mercado B, Kogut PC, Halayko AJ, Solway J, Gerthoffer WT (2014): MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 307, L727–L734
- Cox FM, Titulaer MJ, Sont JK, Wintzen AR, Verschuuren JJGM, Badrising UA (2011): A 12-year follow-up in sporadic inclusion body myositis: an end stage with major disabilities. *Brain* 134, 3167–3175
- Dalakas MC (2015): Inflammatory Muscle Diseases. *N Engl J Med* 372, 1734–1747
- De Paepe B, Creus KK, De Bleecker JL (2009): Role of cytokines and chemokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 21, 610–616
- Dimitri D, Benveniste O, Dubourg O, Maisonobe T, Eymard B, Amoura Z, Jean L, Tiev K, Piette JC, Klatzmann D, et al. (2006): Shared blood and muscle CD8+ T-cell expansions in inclusion body myositis. *Brain* 129, 986–995
- Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato AA, Lidov HG, Kang PB, North KN, Mitrani-Rosenbaum S, et al. (2007): Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17016–17021
- El-Mogy M, Lam B, Haj-Ahmad TA, McGowan S, Yu D, Nosal L, Rghei N, Roberts P, Haj-Ahmad Y (2018): Diversity and signature of small RNA in different bodily fluids using next generation sequencing. *BMC Genomics* 19, 408
- Figarella-Branger D, Civatte M, Bartoli C, Pellissier JF (2003): Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve* 28, 659–682
- Fischer SEJ (2015): RNA Interference and MicroRNA-Mediated Silencing. *Curr Protoc Mol Biol* 112, 26.1.1-26.1.5

- Fromm B, Billipp T, Peck LE, Johansen M, Tarver JE, King BL, Newcomb JM, Sempere LF, Flatmark K, Hovig E, Peterson KJ (2015): A Uniform System for the Annotation of Vertebrate microRNA Genes and the Evolution of the Human microRNAome. *Annu Rev Genet* **49**, 213–242
- Georgantas RW, Streicher K, Greenberg SA, Greenlees LM, Zhu W, Brohawn PZ, Higgs BW, Czapiga M, Morehouse CA, Amato A, et al. (2014): Inhibition of Myogenic MicroRNAs 1, 133, and 206 by Inflammatory Cytokines Links Inflammation and Muscle Degeneration in Adult Inflammatory Myopathies. *Arthritis Rheumatol* **66**, 1022–1033
- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, et al. (2008): Serum MicroRNAs Are Promising Novel Biomarkers. *PLoS One* **3**, e3148
- Goebels N, Michaelis D, Wekerle H, Hohlfield R (1992): Human myoblasts as antigen-presenting cells. *J Immunol* **149**, 661–667
- Greco S, De Simone M, Colussi C, Zaccagnini G, Fasanaro P, Pescatori M, Cardani R, Perbellini R, Isaia E, Sale P, et al. (2009): Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J* **23**, 3335–3346
- Greenberg SA (2020): Pathogenesis of inclusion body myositis. *Curr Opin Rheumatol* **32**, 542–547
- Greenberg SA, Pinkus JL, Kong SW, Baecher-Allan C, Amato AA, Dorfman DM (2019): Highly differentiated cytotoxic T cells in inclusion body myositis. *Brain* **142**, 2590–2604
- Guess MG, Barthel KKB, Harrison BC, Leinwand LA (2015): miR-30 Family microRNAs Regulate Myogenic Differentiation and Provide Negative Feedback on the microRNA Pathway. *PLoS One* **10**, e0118229
- Hamm A, Krott N, Breibach I, Blindt R, Bosserhoff AK (2002): Efficient Transfection Method for Primary Cells. *Tissue Eng* **8**, 235–245
- Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R (2015): InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* **16**, 169
- Hirai T, Ikeda K, Tsushima H, Fujishiro M, Hayakawa K, Yoshida Y, Morimoto S, Yamaji K, Takasaki Y, Takamori K, et al. (2018): Circulating plasma microRNA profiling in patients with polymyositis/dermatomyositis before and after treatment: miRNA may be associated with polymyositis/dermatomyositis. *Inflamm Regen* **38**, 1
- Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J (2016): Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Dev Biol* **410**, 1–13

- Hua YT, Xu WX, Li H, Xia M (2021): Emerging roles of MiR-133a in human cancers. *J Cancer* 12, 198–206
- Iacona JR, Lutz CS (2019): miR-146a-5p: Expression, regulation, and functions in cancer. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 10, e1533
- Islam MR, Lbik D, Sakib MS, Maximilian Hofmann R, Berulava T, Jiménez Mausbach M, Cha J, Goldberg M, Vakhtang E, Schiffmann C, et al. (2021): Epigenetic gene expression links heart failure to memory impairment. *EMBO Mol Med* 13, e11900
- Israeli D, Poupiot J, Amor F, Charton K, Lostal W, Jeanson-Leh L, Richard I (2016): Circulating miRNAs are generic and versatile therapeutic monitoring biomarkers in muscular dystrophies. *Sci Rep* 6, 28097
- Kinder TB, Heier CR, Tully CB, Van der Muelen JH, Hoffman EP, Nagaraju K, Fiorillo AA (2020): Muscle Weakness in Myositis: MicroRNA-Mediated Dystrophin Reduction in a Myositis Mouse Model and Human Muscle Biopsies. *Arthritis Rheumatol* 72, 1170–1183
- Labbaye C, Testa U (2012): The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J Hematol Oncol* 5, 13
- Lemcke H, Steinhoff G, David R (2015): Gap junctional shuttling of miRNA — A novel pathway of intercellular gene regulation and its prospects in clinical application. *Cell Signal* 27, 2506–2514
- Liu Y, Pan Q, Zhao Y, He C, Bi K, Chen Yusen, Zhao B, Chen Yanfang, Ma X (2015): MicroRNA-155 Regulates ROS Production, NO Generation, Apoptosis and Multiple Functions of Human Brain Microvessel Endothelial Cells Under Physiological and Pathological Conditions. *J Cell Biochem* 116, 2870–2881
- Mahesh G, Biswas R (2019): MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 39, 321–330
- Mechtler P, Singhal R, Kichina JV, Bard JE, Buck MJ, Kandel ES (2015): MicroRNA analysis suggests an additional level of feedback regulation in the NF- κ B signaling cascade. *Oncotarget* 6, 17097–17106
- Mott JL, Mohr AM (2015): Overview of MicroRNA Biology. *Semin Liver Dis* 35, 3–11
- Muth IE, Barthel K, Bähr M, Dalakas MC, Schmidt J (2009): Proinflammatory cell stress in sporadic inclusion body myositis muscle: overexpression of α B-crystallin is associated with amyloid precursor protein and accumulation of β -amyloid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80, 1344–1349

- Muth IE, Zschüntzsch J, Kleinschnitz K, Wrede A, Gerhardt E, Balcarek P, Schreiber-Katz O, Zierz S, Dalakas MC, Voll RE, Schmidt J (2015): HMGB1 and RAGE in skeletal muscle inflammation: Implications for protein accumulation in inclusion body myositis. *Exp Neurol* 271, 189–197
- Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, Cuvellier S, Harel-Bellan A (2006): The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol* 8, 278–284
- Navickas R, Gal D, Laucevičius A, Taparuskaitė A, Zdanytė M, Holvoet P (2016): Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. *Cardiovasc Res* 111, 322–337
- Nie M, Liu J, Yang Q, Seok HY, Hu X, Deng ZL, Wang DZ (2016): MicroRNA-155 facilitates skeletal muscle regeneration by balancing pro- and anti-inflammatory macrophages. *Cell Death Dis* 7, e2261
- Nogalska A, D'Agostino C, Terracciano C, Engel WK, Askanas V (2010): Impaired Autophagy in Sporadic Inclusion-Body Myositis and in Endoplasmic Reticulum Stress-Provoked Cultured Human Muscle Fibers. *Am J Pathol* 177, 1377–1387
- Panguluri SK, Bhatnagar S, Kumar Akhilesh, McCarthy JJ, Srivastava AK, Cooper NG, Lundy RF, Kumar Ashok (2010): Genomic Profiling of Messenger RNAs and MicroRNAs Reveals Potential Mechanisms of TWEAK-Induced Skeletal Muscle Wasting in Mice. *PLoS One* 5, e8760
- Park M, Choi S, Kim S, Kim J, Lee DK, Park W, Kim T, Jung J, Hwang JY, Won MH, et al. (2019): NF- κ B-responsive miR-155 induces functional impairment of vascular smooth muscle cells by downregulating soluble guanylyl cyclase. *Exp Mol Med* 51, 17
- Parkes JE, Day PJ, Chinoy H, Lamb JA (2015): The role of microRNAs in the idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 27, 608–615
- Parkes JE, Thoma A, Lightfoot AP, Day PJ, Chinoy H, Lamb JA (2020): MicroRNA and mRNA profiling in the idiopathic inflammatory myopathies. *BMC Rheumatol* 4, 25
- Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, Singha RKS, Malakar AK, Chakraborty S (2018): Interplay between miRNAs and human diseases. *J Cell Physiol* 233, 2007–2018
- Paulson H (2006): RNA interference as potential therapy for neurodegenerative disease: applications to inclusion-body myositis? *Neurology* 66, 114–117
- Pluk H, van Hoeve BJA, van Dooren SHJ, Stammen-Vogelzangs J, van der Heijden A, Schelhaas HJ, Verbeek MM, Badrising UA, Arnardottir S, Gheorghe K, et al. (2013): Autoantibodies to cytosolic 5'-nucleotidase 1A in inclusion body myositis. *Ann Neurol* 73, 397–407

- Roberts TC, Blomberg KEM, McClorey G, Andaloussi SE, Godfrey C, Betts C, Coursindel T, Gait MJ, Edvard Smith C, Wood MJ (2012): Expression Analysis in Multiple Muscle Groups and Serum Reveals Complexity in the MicroRNA Transcriptome of the mdx Mouse with Implications for Therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 1, e39
- Rose MR (2013): 188th ENMC International Workshop: Inclusion Body Myositis, 2–4 December 2011, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 23, 1044–1055
- Rupaimoole R, Slack FJ (2017): MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 16, 203–222
- Rygiel KA, Miller J, Grady JP, Rocha MC, Taylor RW, Turnbull DM (2015): Mitochondrial and inflammatory changes in sporadic inclusion body myositis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 41, 288–303
- Saba R, Sorensen DL, Booth SA (2014): MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Front Immunol* 5, 578
- Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH (2019): An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol* 234, 5451–5465
- Schmidt J (2018): Current Classification and Management of Inflammatory Myopathies. *J Neuromuscul Dis* 5, 109–129
- Schmidt J, Dalakas MC (2013): Inclusion body myositis: from immunopathology and degenerative mechanisms to treatment perspectives. *Expert Rev Clin Immunol* 9, 1125–1133
- Schmidt J, Barthel K, Wrede A, Salajegheh M, Bähr M, Dalakas MC (2008): Interrelation of inflammation and APP in sIBM: IL-1 β induces accumulation of β -amyloid in skeletal muscle. *Brain* 131, 1228–1240
- Schmidt J, Barthel K, Zschüntzsch J, Muth IE, Swindle EJ, Hombach A, Sehmisch S, Wrede A, Lühder F, Gold R, Dalakas MC (2012): Nitric oxide stress in sporadic inclusion body myositis muscle fibres: inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents interleukin-1 β -induced accumulation of β -amyloid and cell death. *Brain* 135, 1102–1114
- Schmidt K, Schmidt J (2017): Inclusion body myositis: advancements in diagnosis, pathomechanisms, and treatment. *Curr Opin Rheumatol* 29, 632–638
- Spriggs KA, Bushell M, Willis AE (2010): Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress. *Mol Cell* 40, 228–237
- Su LC, Huang AF, Jia H, Liu Y, Xu WD (2017): Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 20, 1631–1637

- Sun Y, Li Y, Wang H, Li H, Liu S, Chen J, Ying H (2017): miR-146a-5p acts as a negative regulator of TGF- β signaling in skeletal muscle after acute contusion. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 49, 628–634
- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D (2006): NF- κ B-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
- Testa U, Pelosi E, Castelli G, Labbaye C (2017): miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Noncoding RNA* 3, 22
- Townley-Tilson WHD, Callis TE, Wang DZ (2010): MicroRNAs 1, 133, and 206: Critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1252–1255
- Uruha A, Goebel HH, Stenzel W (2021): Updates on the Immunopathology in Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Curr Rheumatol Rep* 23, 56
- Vattemi G, Engel WK, McFerrin J, Askanas V (2004): Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Inclusion Body Myositis Muscle. *Am J Pathol* 164, 1–7
- Wan J, Xia L, Xu W, Lu N (2016): Expression and Function of miR-155 in Diseases of the Gastrointestinal Tract. *Int J Mol Sci* 17, 709
- Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, Melms A, Lochmuller H, Hohlfeld R, Weller M (2003): Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2-related inducible co-stimulatory molecule, ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain* 126, 1026–1035
- Xu D, Huang CC, Kachaochana A, Morgan GA, Bonaldo MF, Soares MB, Costa F, Sarwark J, Sredni ST, Pachman LM (2016): MicroRNA-10a Regulation of Proinflammatory Mediators: An Important Component of Untreated Juvenile Dermatomyositis. *J Rheumatol* 43, 161–168
- Ye Z, Shi J, Ning Z, Hou L, Hu CY, Wang C (2020): MiR-92b-3p inhibits proliferation and migration of C2C12 cells. *Cell Cycle* 19, 2906–2917
- Zaharieva IT, Calissano M, Scoto M, Preston M, Cirak S, Feng L, Collins J, Kole R, Guglieri M, Straub V, et al. (2013): Dystromirs as Serum Biomarkers for Monitoring the Disease Severity in Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One* 8, e80263
- Zhang BW, Cai HF, Wei XF, Sun JJ, Lan XY, Lei CZ, Lin FP, Qi XL, Plath M, Chen H (2016): miR-30-5p Regulates Muscle Differentiation and Alternative Splicing of Muscle-Related Genes by Targeting MBNL. *Int J Mol Sci* 17, 182

Zheng B, Yin W, Suzuki T, Zhang X, Zhang Y, Song L, Jin L, Zhan H, Zhang H, Li J, Wen J (2017):
Exosome-Mediated miR-155 Transfer from Smooth Muscle Cells to Endothelial Cells Induces
Endothelial Injury and Promotes Atherosclerosis. *Mol Ther* 25, 1279–1294

Danksagung

Mein größter Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Jens Schmidt. Er unterstützte mich während des gesamten Projekts herausragend, sodass ich mich jederzeit fachlich und persönlich auf ihn verlassen konnte.

Ebenso möchte ich ausdrücklich Dr. med. Karsten Kummer für die Betreuung danken. Mit Rat und Tat half er bei allen Fragen, fachlichen und persönlichen, und förderte allzeit meine Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern aus dem Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen in Göttingen. Prof. Dr. André Fischer stand mir als Zweitbetreuer meiner Arbeit stets hilfreich zur Seite. PhD Rezaul Islam unterstützte mich bei den Sequenzierungen und Fragen zur Methodik.

Mein großer Dank gilt auch den anderen Kooperationspartnern. Prof. Dr. Uwe Michel beriet mich zu Transfektionen und stellte Plasmide zur Verfügung. Die Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen, insbesondere Dr. med. Sabrina Zechel, stellte die Muskelbiopsien bereit. Dr. med. Peter Korsten aus der Rheumatologie unterstützte mich bei der Sammlung der Blutproben.

Nicht zuletzt möchte ich Iris Iben für die ausgezeichnete technische Unterstützung herzlich danken. Sie und die restlichen Mitglieder der AG Schmidt boten im Labor unverzichtbare Hilfe, Rat und Motivation.