

Aus der Klinik und Poliklinik für
Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. Jürgen Deckert

***SLC6A2*-regulierende microRNAs
bei Angsterkrankungen:
Genexpressions- und
Assoziationsuntersuchungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Konstantin Lang
aus Lindau

Würzburg, März 2021

Referent: Prof. Dr. Jürgen Deckert
Koreferent: Prof. Dr. Antje Gohla
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Februar 2021

Der Promovend ist Arzt.

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Hommers L. G., Richter J., Yang Y., Raab A., Baumann C., Lang K, u. a.
„A functional genetic variation of SLC6A2 repressor hsa-miR-579-3p
upregulates sympathetic noradrenergic processes of fear and anxiety“.
In: Transl Psychiatry (Okt. 2018). doi: 10.1038/s41398-018-0278-4.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vi
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Angsterkrankungen	1
1.1.1 Überblick und Definition Angsterkrankungen	1
1.1.2 Epidemiologie von Angsterkrankungen	3
1.1.3 Ätiopathogenese von Angsterkrankungen	4
1.1.4 Behandlung von Angsterkrankungen	5
1.2 Das noradrenerge System	7
1.2.1 <i>SLC6A2</i>	7
1.2.2 <i>SLC6A2</i> im Kontext von Angsterkrankungen	8
1.3 Genregulation durch microRNAs	10
1.3.1 Entdeckung von microRNAs	10
1.3.2 Biogenese und Prozessierung im Menschen	12
1.3.3 Mechanismen des microRNA-regulierten Gen-Silencing	14
1.3.4 microRNA Umsatz	16
1.3.5 Nomenklatur von microRNAs	16
1.3.6 microRNA als Biomarker	17
1.3.7 microRNA-Veränderungen bei Angsterkrankungen	19
1.4 Fragestellung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Verwendete Materialien	22
2.1.1 Medien, Puffer und Lösungen	22
2.1.2 Transfektionsreagenzien	22
2.1.3 Reagenzien für Luciferase-Assay	24
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.5 Software	26

2.2	Methoden	27
2.2.1	Prädiktion potentieller microRNA-Regulatoren von <i>SLC6A2</i>	27
2.2.1.1	TargetScan 6.2	30
2.2.1.2	DIANA microT-CDS	31
2.2.1.3	miRDB 4.0	31
2.2.2	Genexpressionsanalysen	32
2.2.2.1	Kultivierung der Zellen	32
2.2.2.2	Transiente Co-Transfektion	33
2.2.2.3	Prinzip des Luciferase Assay	34
2.2.2.4	Durchführung des Luciferase Assay	37
2.2.3	Genetische Analysen	40
2.2.3.1	Genotypisierung	40
2.2.3.2	Assoziationsanalyse	41
2.2.3.3	Statistische Analyse	44
3	Ergebnisse	46
3.1	<i>In silico</i> -Prädiktion potentieller microRNA-Regulatoren von <i>SLC6A2</i>	46
3.2	Ergebnisse Genexpressionsanalysen	48
3.2.1	Ergebnisse Luciferase-Assay	48
3.2.2	Vergleich Ergebnisse mit Prädiktionen	49
3.3	Genetische Analysen	53
3.3.1	Assoziationsanalyse SNP x PD/AG	53
3.3.2	Assoziationsanalyse ASI/ACQ - lineare Regression	55
4	Diskussion	56
4.1	<i>In silico</i> -Prädiktion potentieller microRNA-Regulatoren von <i>SLC6A2</i>	56
4.2	Genexpressionsanalysen	59
4.2.1	Diskussion Methodik Luciferase-Assay	59
4.2.2	Diskussion Ergebnisse Prädiktion und Luciferase-Assay	62
4.3	Genetische Analysen	65
4.3.1	Diskussion Methodik Assoziationsstudie	65
4.3.2	Diskussion Ergebnisse Assoziationsstudie	67
4.4	Ausblick	70
5	Zusammenfassung	75
6	Literaturverzeichnis	77
7	Anhang	89

Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	3'-untranslatierten Region
5'-UTR	5'-untranslatierten Region
ACQ	Agoraphobic Cognitions Questionnaire
AGO2	Protein argonaute-2
ASI	Anxiety Sensitivity Index
CDS	codierende Sequenz
DA	Dopamin
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GWAS	Genomweite-Assoziationsstudie
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
kb	Kilobasen
MAF	Minor Allele Frequency
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
NA	Noradrenalin
NET	Noradrenalin-Transporter
nt	Nukleotide
PABP	Poly(A)-Binding-Protein

Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNRI	Selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
SSNRI	Selektive Serotonin-/Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
TCA	Trizyklische Antidepressiva

Abbildungsverzeichnis

1.1	PubMed-Veröffentlichungen zum Thema microRNA	11
1.2	Biogenese und Prozessierung humaner microRNA	13
1.3	Typische Struktur einer eukaryontischen mRNA	14
1.4	microRNA Degradation durch Deadenylierung	15
2.1	Flussdiagramm der in der Arbeit angewendeten Vorgehensweise .	27
2.2	Unterscheidung verschiedener Seed-Regionen je nach Basenpaarung	29
2.3	Schematische Darstellung Layout 96-well Platte	34
2.4	Schematische Darstellung des verwendeten Luciferase-Vektors . .	35
2.5	Prinzip des Luciferase-Assay	36
2.6	Exemplarische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Lumineszenzmessung	38
2.7	Prinzip der allelspezifischen kompetitiven KASP™-PCR	42
3.1	Boxplot der Ergebnisse des Luciferase-Assay	50
3.2	Streudiagramm TS-Prädiktion vs. normierte Luciferase-Aktivität . .	51
3.3	Streudiagramm DIANA-Prädiktion vs. normierte Luciferase-Aktivität	51
3.4	Streudiagramm miRDB-Prädiktion vs. normierte Luciferase-Aktivität	52
4.1	Streudiagramm der Screening-microRNAs – TargetScan 7.0-Score vs. normierte Luciferase-Aktivität (retrospektive Betrachtung) . . .	59

Tabellenverzeichnis

1.1	Nomenklatur von microRNAs	17
2.1	Übersicht der verwendeten miRNA	23
3.1	Übersicht der von TargetScan, DIANA microT-CDS und miRDB prädiktierten microRNA-Regulatoren	46
3.2	Übersicht Screening <i>SLC6A2</i> -Regulation durch microRNAs	48
3.3	Prädiktionsergebnisse der <i>in vitro</i> in Bezug auf die Inhibition im Luciferase-Assay effektivsten microRNA	52
3.4	Allelfrequenzen der untersuchten Einzelbasenpolymorphismen	54
3.5	Assoziationsanalyse – rs2910931 und rs2582372 detailliert	54
3.6	Regressionsanalyse Genotypen – ASI/ACQ-Summenscores	55

1 Einleitung

1.1 Angsterkrankungen

1.1.1 Überblick und Definition Angsterkrankungen

Unter dem Begriff „Angsterkrankung“ werden psychische Erkrankungen zusammengefasst, bei welchen die „Furcht“ (altgriechisch: φόβος phóbos = „Furcht“, „Angst“) vor einer konkreten Situation bzw. einem Objekt („Phobien“) oder eine unspezifische, unverhältnismäßige „Angst“ bei den betroffenen Personen im Vordergrund steht. Das „International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD)“ in Version 10 unterscheidet „phobischen Störungen“ (F40) und „andere Angststörungen“ (F41).

Bei phobischen Störungen bewirken definierte, für gewöhnlich ungefährliche Situationen oder Gegenstände ein Gefühl der Angst bei Betroffenen. Dies kann sich z. B. in Herzklopfen oder einem Schwächegefühl äußern und zukünftig zu Vermeidungsverhalten und einer Erwartungsangst führen. Oftmals treten phobische Störungen gemeinsam mit Depressionen auf, wobei eine separate Betrachtung der Diagnosen vom zeitlichen Verlauf des Zustands abhängig gemacht werden sollte [1].

Die „Agoraphobie“ (altgriechisch αγορά agora = „Marktplatz“ und φόβος phóbos = „Furcht“, „Angst“) (F40.0) bezeichnet eine Furcht, welche durch bestimmte Orte bzw. Situationen wie weitläufige Plätze, Menschenansammlungen oder aber auch z. B. öffentliche Transportmittel ausgelöst wird, in denen ein rasches Entkommen für die Einzelperson nicht ohne weiteres möglich ist. Bei den Agoraphobien wird

zudem unterschieden ob in der Vorgeschichte des Patienten eine Panikstörung vorhanden ist.

Die „soziale Phobie“ (F40.1) ist gekennzeichnet durch die Angst, in sozialen Situationen mit Menschen außerhalb des eigenen Vertrauenskreises durch peinliches oder beschämendes Verhalten in das Zentrum der Aufmerksamkeit zu rücken, und negativ aufzufallen. Symptome wie Herzklopfen, Händezittern, Übelkeit etc. können sich bis zu Panikattacken steigern und zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensführung- und qualität führen.

„Spezifische (isolierte) Phobien“ (F40.2) sind auf genaue, eng gefasste Situationen oder Objekte bezogen, wie beispielsweise Tiere, Naturereignisse, Höhe, Zahnarztbesuche usw.

Die „Panikstörung“ (F41.0) – auch als „episodisch paroxysmale Angst“ bezeichnet – hat als Hauptmerkmal eine wiederkehrende, in Attacken auftretende Panik, welche *nicht* durch eine spezifische Situation oder ein konkretes Objekt hervorgerufen wird. Zu den Hauptsymptomen zählen wie bei anderen Angsterkrankungen z. B. Herzklopfen, Brustschmerz, Schwindel, bis hin zu Gefühlen der Entfremdung. Die Attacke beginnt unversehens und hält mindestens wenige Minuten an. Zur Diagnose einer Panikstörung nach ICD-10 bedarf es einem gehäuften Auftreten von Anfällen in einem bestimmten Zeitraum, wobei angstfreie Intervalle vorhanden sein müssen und eine organische Ursache ausgeschlossen sein muss. Abzugrenzen ist jedoch die „Panikstörung mit Agoraphobie“ (F40.01), bei der sich die Panikattacken auf die Agoraphobie zurückführen lässt.

Bei der „generalisierten Angststörung“ (F41.1) kommt es zu einer Verselbstständigung der Angst, bei der die Angst anhaltend, umfassend und ohne Relation ist, ohne dabei an bestimmte Situationen gebunden zu sein. Um die Diagnose nach ICD-10 stellen zu können, müssen Befürchtungen wie z. B. eine unverhältnismäßige Angst vor einer Erkrankung oder Unglücken, motorische Spannungen, vegetative und psychische Symptome sowie Symptome wie Atembeschwerden,

Beklemmungsgefühl oder Übelkeit, an den meisten Tagen über einen Zeitraum von 6 Monaten vorliegen.

Es existieren verschiedene Messinstrumente, mit welchen bestimmte Aspekte der Angst gemessen und abgebildet werden können. In Rahmen dieser Arbeit fanden die folgenden Verwendung:

Anxiety Sensitivity Index (ASI) Der ASI ist ein Fragebogen zur Messung der Angstsensitivität und umfasst 16 Fragen zur kognitiven Verarbeitung körperlicher Symptome (z. B. „Es macht mir Angst, wenn mein Herz rast“) auf einer fünfstufigen Skala von 0 („kaum“) bis 4 („sehr“). Die Auswertung erfolgt durch Summenbildung [2]. Insbesondere Patienten mit Angststörungen oder affektiven Störungen weisen eine ausgeprägte Angstsensitivität auf. Es konnte gezeigt werden, dass Personen mit hoher Angstsensitivität häufiger eine Panikstörung entwickeln [3].

Agoraphobic Cognitions Questionnaire (ACQ) Der ACQ ist ein Fragebogen zu angstbezogenen Kognitionen und misst die Ausprägung 15 angstbezogener Gedanken auf einer fünfstufigen Skala von 1 („der Gedanke kommt nie vor“) bis 5 („der Gedanke kommt immer vor“). Die Auswertung erfolgt durch Bildung des arithmetischen Mittels. Der ACQ kann zwischen Agoraphobikern bzw. Patienten mit Angststörungen und Kontrollpersonen trennen, erlaubt jedoch keine zuverlässige Diskrimination zwischen Agoraphobikern und Menschen mit anderen Angststörungen [4].

1.1.2 Epidemiologie von Angsterkrankungen

Laut dem Zusatzmodul „Psychische Gesundheit“ (DEGS1-MH) der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ (n = 5317) beträgt die 12-Monats-Prävalenz einer Angsterkrankung (die Studie fasst darunter folgende Krankheiten zusammen: Panikstörung (mit und ohne Agoraphobie), Agoraphobie, Soziale Phobie,

Generalisierte Angststörung, Spezifische Phobien) in Deutschland bei Personen im Alter zwischen 18 und 79 Jahren 15,3 %. Dies entspricht bei einer Bezugsgröße von 64,1 Millionen Deutschen dieses Alters einer Anzahl von 9,8 Millionen Menschen in der Bundesrepublik [5]. Besonders häufig treten spezifische Phobien auf, welche aufgrund der oftmals vergleichsweise geringen Beeinträchtigung des Alltags jedoch häufig nicht erfasst werden. Der Anteil der Frauen unter Patienten mit einer Angsterkrankung ist etwas doppelt so groß wie der Anteil der Männer [5]. Bezüglich der Chronizität der Erkrankung sowie der psychosozialen Krankheitslast nehmen die Angsterkrankungen gemäß einem Report der „U.S. Burden of Disease Collaborators“ über den Gesundheitszustand der Vereinigten Staaten von Amerika vordere Plätze ein [6]. Berechnungen ausgehend von europaweiten Daten (alle EU-Staaten plus Island, Norwegen und der Schweiz) zum Thema Krankheitskosten beziffern die kumulativen Kosten von Agoraphobien, generalisierten Angststörungen, Panikstörungen sowie sozialen und spezifischen Phobien zusammen auf über 63 Milliarden € – etwas weniger als die aggregierten Krankheitskosten für Schlaganfälle [7]. Dies lässt sich mitunter durch die große Zahl an betroffenen Menschen erklären sowie die mit der Krankheit einhergehenden gravierenden Einschränkungen im privaten und beruflichen Leben.

1.1.3 Ätiopathogenese von Angsterkrankungen

Gemäß einer Metaanalyse von Daten aus Familien- und Zwillingsstudien zeigen Angsterkrankungen eine signifikante familiäre Häufung. Die Heritabilität verschiedener Angsterkrankungen variiert dabei in einem Bereich von etwa 30-60 % [8]. Hierbei folgt die Vererbung einem polygenetischen Modell, in dem viele verschiedene Gene in einem komplexen Zusammenspiel mit biologischen und umweltbedingten Faktoren zu einer Anfälligkeit gegenüber der Entstehung von Angststörungen im Sinne des Diathese-Stress-Modells führen.

Neben Risiko-Loci für Panikstörungen und Phobien, welche durch Kopplungs-

Analysen identifiziert wurden, konnten diverse Kandidatengene mittels Assoziationsuntersuchungen und Genomweite-Assoziationsstudie (GWAS) ermittelt werden [9]. Insbesondere für Panikstörungen konnten mittels GWAS bereits verschiedene Suszeptibilitäts-Loci ermittelt werden [10]. Jeder dieser potentiellen Loci vermag letztlich jedoch nur zu einer diskreten Erhöhung des individuellen Risikos führen.

Neben genetischen Faktoren werden auch Umwelteinflüsse und psychosoziale Faktoren bei der Entstehung von Angsterkrankungen diskutiert. So kann der Konsum von Nikotin oder Koffein als Risikofaktor für die Entstehung von Panikstörungen und generalisierten Angststörungen betrachtet werden [11]. Zudem konnte bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten, welche mit einer Panikstörung diagnostiziert wurden, mindestens ein belastendes Lebensereignis festgestellt werden, welches der ersten Panikattacke vorausging. Auch frühe belastende Lebensereignisse scheinen das Risiko für eine spätere Angsterkrankung zu erhöhen [12]. Darüberhinaus gibt es Hinweise darauf, dass auch dynamische Veränderungen am Epigenom, wie z. B. Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Methylierung, zur Biologie von Angsterkrankungen beitragen, woran bereits unter anderem im Rahmen von epigenomweiten Assoziationsstudien geforscht wird [10, 13].

1.1.4 Behandlung von Angsterkrankungen

Liegt bei dem Erkrankten ein belastender Leidensdruck, psychosoziale Einschränkungen oder bereits potentielle Komplikationen der Angsterkrankungen vor, sollte eine Therapie initiiert werden. Ziel der Behandlung liegt in der Linderung der Angstsymptome, um neben der alltäglichen und beruflichen Leistungsfähigkeit die Lebensqualität zu verbessern. Dazu stehen gemäß der S3-Leitlinie „Behandlung von Angststörungen“ (AWMF-Reg.-Nr.: 051-028) psychotherapeutische Ansätze wie die kognitive Verhaltenstherapie als auch pharmakologische Optionen zur Verfügung. In erster Linie werden beim Vorliegen einer Panikstörung, spezifischen Phobie oder generalisierten Angsterkrankung Selektive Serotonin-Wieder-

aufnahmehemmer (SSRI) eingesetzt; daneben finden Selektive Serotonin-/Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI) häufig Verwendung. Benzodiazepine werden aufgrund gravierender Nebenwirkungen nur in begründeten Ausnahmefällen zeitlich befristet verordnet. Nichtsdestoweniger zeigt sich nur bei etwa 60% der Angstpatienten ein Ansprechen auf obige Therapien. Bei einem großen Teil verbleibt eine Restsymptomatik bzw. kommt es zur Therapierefraktärität [14]. Angesichts der hohen Prävalenz in der Bevölkerung, müssen somit eine beachtliche Zahl an Menschen trotz Behandlung unter Angsterkrankungen leiden.

1.2 Das noradrenerge System

Das Katecholamin Noradrenalin (NA) ist an vielen physiologischen Vorgängen beteiligt. Peripher wird es vom Nebennierenmark produziert und als Hormon ausgeschüttet, wodurch es vor allem Wirkung auf das Herz-Kreislaufsystem und die Bronchialmuskulatur ausübt. Zentral wirkt NA als Neurotransmitter, wobei sich verschiedene Orte noradrenerger Neurone feststellen lassen. Eine besonders hohe Dichte zeigt sich im Bereich des Locus caeruleus, einem vergleichsweise kleinen Bereich der Pons [15]. Ausgehend hiervon ziehen Projektionen zu fast allen Teilen des zentralen Nervensystems. Über G-Protein-gekoppelte α_{1-2} - und β_{1-3} -Rezeptoren wird das Verhalten beispielsweise im Sinne einer gesteigerten Aufmerksamkeit und Erregung bis hin zu Unruhe und Angst gesteuert. Darüber hinaus ist NA an der zentralen Kontrolle der Gedächtnisfunktion, Stimmung und dem Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt [16]. Hierdurch sind bei Fehlsteuerung des noradrenergen Systems zahlreiche neurobiologische Pathologien denkbar.

Die NA-Synthese erfolgt ausgehend von der Aminosäure Tyrosin überwiegend im Zytoplasma noradrenerger Neurone über die Zwischenstufe Dihydroxyphenylalanin. Dieses wird mittels der DOPA-Decarboxylase zu Dopamin decarboxyliert. Die weitere Umwandlung zu NA durch die Dopamin- β -Hydroxylase erfolgt vorwiegend innerhalb der synaptischen Vesikel. Nach der Ausschüttung in den synaptischen Spalt und Bindung an Rezeptoren erfolgt die Wiederaufnahme in die präsynaptische Endigung vor allem durch den Noradrenalin-Transporter (NET). Der Abbau wird katalysiert durch Monoaminoxidasen und die Catechol-O-Methyltransferase.

1.2.1 SLC6A2

NET ist ein Na^+/Cl^- -abhängiger Neurotransmittertransporter der *solute carrier 6* (SLC6) Familie und ist auch als *SLC6A2* bekannt. Neben dessen primärem Sub-

strat NA, kann NET auch Dopamin (DA) transportieren [17]. *SLC6A2* ist auf Chromosom 16q12.2 lokalisiert, umfasst etwa 45 Kilobasen (kb) und enthält 14 Exons; das daraus resultierende 69 kDa große Protein hat eine Länge von 617 Aminosäuren und ist aus 12 Transmembrandomänen aufgebaut [18].

NET ist verantwortlich für die Wiederaufnahme von NA und DA in die präsynaptischen Nervenendigungen [16] und beeinflusst zahlreiche Funktionen des zentralen und des sympathischen Nervensystems wie Lernen, Stimmung, Aufmerksamkeit oder Stress [19]. NA übt weitreichende Effekte über verschiedenste Regionen des Gehirns aus, indem es unter anderem regulative Funktionen über Arousal und Stress moduliert [20].

Es zeigen sich Hinweise, dass ein Defekt von *SLC6A2* möglicherweise mit Bluthochdruck [21, 22] und orthostatischer Intoleranz [23] bzw. dem posturalen Tachykardiesyndrom assoziiert ist [24]. Trotz dieser anscheinend großen Unterschiedlichkeit der klinischen Auswirkungen, lassen sich gemeinsame Faktoren entdecken. So sind beispielsweise Angsterkrankungen häufig mit Hypertension oder dem posturalen Tachykardiesyndrom assoziiert [25, 26].

Viele Antidepressiva wie Trizyklische Antidepressiva (TCA), Selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRI) oder SSNRI üben ihre Effekte aus, indem sie unter anderem NET inhibieren und somit die Verfügbarkeit von NA im synaptischen Spalt erhöhen [27], und gelten als wichtige Optionen in der pharmakologischen Behandlung von Angsterkrankungen. Dies macht *SLC6A2* zu einem attraktiven Kandidatengen in Bezug auf diese Erkrankungen.

1.2.2 *SLC6A2* im Kontext von Angsterkrankungen

Eingeschränkte Funktionen des NET sind bei Patienten mit Panikstörung bekannt [28]. Verschiedene Aspekte liefern Hinweise auf eine Beteiligung des noradrenergen Systems bei Angsterkrankungen. Neben erhöhten Plasma- und Urinkonzen-

trationen von Noradrenalin und dessen Metaboliten während Panikattacken [29], führt ein Provokationstest mit einem α_2 -Rezeptor-Antagonist bei Patienten mit Panikstörung zu einem erhöhten Anstieg an Angst-verbundenen Parametern im Vergleich zu gesunden Kontrollen [30].

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die prominente Rolle der Monoamintransporter in der Behandlung von Angsterkrankungen. Folglich wird *SLC6A2* auch als potentieller Kandidatengene bei Panikstörungen diskutiert.

In einer explorativen Studie an 115 deutschen Patienten mit Panikstörung sowie einer entsprechenden Anzahl gesunder Kontrollen, zeigten sich zwei Polymorphismen (rs2397771 und rs2242446) in der Untergruppe von Patienten mit ‚Panikstörungen ohne Agoraphobie‘ assoziiert, jedoch konnte keine Assoziation mit der übergeordneten Diagnose ‚Panikstörung‘ hergestellt werden [31].

In einer weiteren Fall-Kontroll-Studie (449 dänische und deutsche Patienten mit Panikstörung mit/ohne Agoraphobie; 279 ethnisch gematchte Kontrollen) zeigten 7 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) innerhalb der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) des Gens eine Assoziation auf, wobei ein SNP (rs747107) auch nach Korrektur für multiples Testen signifikant blieb [32].

In einer japanischen, bereits einfach replizierten GWAS konnten keine mit Panikstörung assoziierten SNPs sicher identifiziert werden [33].

Eine weitere europäische Fall-Kontroll-Studie, welche den Polymorphismus rs7194256 in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) von *SLC6A2* untersuchte kam zu dem Schluss, dass Träger des T-Allels erhöhte Angst-Scores in den entsprechenden Fallgruppen im Vergleich zu gesunden Kontrollen aufwiesen. Zudem konnten bei ihnen signifikant höhere arterielle NA-Werte festgestellt werden [34].

In Bezug auf epigenetische Phänomene war initial eine Hypermethylierung der NET-Promoter-Region in Patienten mit Panikstörung vermutet worden [35] – ein Ergebnis, welches sich schließlich jedoch nicht replizieren ließ [36].

1.3 Genregulation durch microRNAs

1.3.1 Entdeckung von microRNAs

Die erste microRNA (miRNA) wurde 1993 im Rahmen einer Studie der Entwicklungsstufen von *Caenorhabditis elegans* entdeckt. Viktor Ambros, Rosalind Lee und Rhonda Feinbaum beobachteten bei der Untersuchung verschiedener Entwicklungsstufen der Larven dieses Fadenwurms, dass das Gen *lin-4* überraschenderweise nicht für ein Protein kodiert, sondern für zwei kurze 22 bzw. 61 Nukleotide (nt) lange Ribonukleinsäure (RNA)-Moleküle. Zudem zeigte sich, dass eine gegenläufige Komplementarität dieser Moleküle zu der 3'-UTR des Gens *lin-14* [37] besteht. Diese Interaktion und die daraus resultierende Inhibition des Gens ließ die Forscher vermuten, dass es sich um eine Möglichkeit der Unterdrückung von Genen in der Entwicklung von Larven handeln könnte [37, 38].

Erst etwa sieben Jahre später wurde eine weitere miRNA in *Caenorhabditis elegans* entdeckt (*let-7*). Diese zeigte eine ähnliche Wirkungsweise wie *lin-4*, indem sie mit der 3'-UTR von *lin-41* und *hbl-1* interagierte und so die Translation verhinderte [39]. Zudem wurde festgestellt, dass *let-7* auch im Genom von Menschen, Drosophila und einigen anderen Zweiseitentieren zu finden ist und somit einen äußerst hohen Grad an Konservierung über verschiedene Spezies hinweg aufweist [40].

Auch viele der daraufhin entdeckten miRNAs zeigen einen mehr oder weniger hohen Konservierungsgrad, teils weit über die eigene Spezies hinaus. Dies deutet darauf hin, dass miRNAs schon über einen langen Zeitraum entwicklungs-geschichtlich relevant sind. Die Entdeckung von pflanzlichen miRNAs legt den Verdacht nahe, dass diese Klasse nichtcodierender RNA möglicherweise bereits seit dem letzten gemeinsamen Vorfahren eine ähnliche regulative Funktion einnehmen könnte [41]. Darüberhinaus wurden miRNAs entdeckt, die nicht auf bestimmte Entwicklungsstufen bezogen waren, sondern vielmehr auf bestimmte

Zellarten, und somit eine Schraubchen in der komplexen Regulierung eines Gewebes bzw. Organismus, aber auch an vielen weiteren Prozessen von Bedeutung sein könnten. Auf diese Weise ließe sich eine feine Abstimmung der Expression des Transkriptoms in verschiedenen Geweben zu verschiedenen Zeiten erklären [42]. Seitdem wurden immer mehr Bereiche entdeckt, in denen die kurzen RNA-Moleküle eine Rolle spielen. Sie beeinflussen beispielsweise die Entstehung von Neoplasien [43], nehmen Einfluss auf die Entwicklung eines Organismus und scheinen gemeinhin ein Bestandteil der meisten biologischen Prozesse und vieler Krankheiten zu sein [44, 45]. Einen Überblick über potentielle Assoziationen von miRNAs und Krankheiten bietet die „Human microRNA Disease Database“ [46].

Studien gehen davon aus, dass mehr als ein Drittel aller menschlichen Gene konservierte Ziele von miRNAs sind [47]. Diese Bedeutung schlägt sich auch in der jährlich zunehmenden Zahl der dazu veröffentlichten Publikationen nieder. Alleine im Jahr 2017 lassen sich weit über 12000 Veröffentlichungen finden, die sich mit miRNA beschäftigen (siehe Abbildung 1.1). Eine entsprechende Dynamik

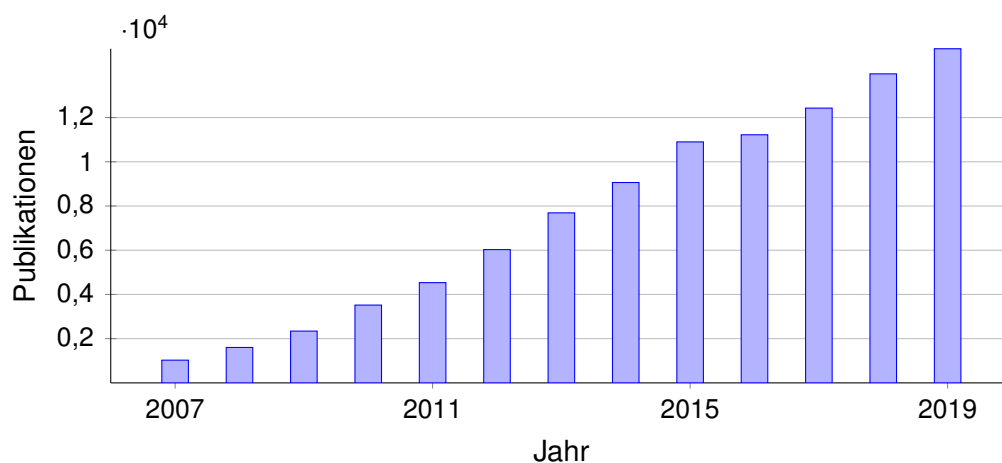


Abbildung 1.1: Zeitlicher Verlauf der Veröffentlichungen zum Thema microRNA innerhalb der letzten Jahre (Quelle: PubMed.gov anhand des Suchbegriffes „microRNA OR miRNA“, Stand: März 2020)

zeigt auch die Entwicklung der in der miRBase-Datenbank [48] annotierten miRNA: waren zu Beginn im Jahr 2002 nur einige Dutzend bekannt, sind in der im Oktober 2018 veröffentlichten Version 22.1 der Datenbank alleine für *Homo*

sapiens bereits mehr als 1900 miRNA beschrieben.

1.3.2 Biogenese und Prozessierung im Menschen

miRNA-Gene sind über das gesamte Genom verteilt. Teils als nicht-kodierende Gene, welche ausschließlich für miRNA kodieren, in anderen Fällen z. B. innerhalb des Introns eines Gens, welches für ein Protein kodiert.

Zunächst wird mithilfe der RNA Polymerase II ein inaktives Primärtranskript erstellt (in wenigen Fällen mittels RNA Polymerase III) [49]. Diese sogenannte pri-miRNA ist gewöhnlich mehrere kb lang und enthält eine bis mehrere charakteristische Haarnadelstrukturen (engl. *stem-loop*). Anschließend wird daraus – etwa zwei Helix-Windungen entfernt von der Basis der Haarnadelstruktur – die ca. 60-70 nt lange Vorgänger-miRNA herausgeschnitten, die sogenannte pre-miRNA [50]. Dies geschieht mithilfe des microprocessor-complex, einem Enzymkomplex, welcher aus den beiden Proteinen Drosha (eine Ribonuklease III) und dem Cofaktor DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) besteht [51, 52]. Die entstandene pre-miRNA besitzt nun an der Schnittstelle einen 2 nt langen 3'-Überhang. Dieser wird vom Rezeptor Exportin-5 erkannt, welcher aktiv mittels RAN-GTP die pre-miRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert [53]. Dort angekommen erkennt das Enzym Dicer (ebenfalls eine Ribonuklease III) die pre-miRNA und kappt die Schleife des Doppelstrangs. Der nun entstandene circa 22 nt lange miRNA:miRNA* Komplex aus doppelsträngiger RNA wird anschließend mittels einer Helikase aufgetrennt. Man geht davon aus, dass die relative thermodynamische Stabilität der Enden der Stränge darüber entscheidet, welcher der beiden Stränge verbleibt und Teil des *silencing complex* wird [54]. In der Regel wird der Komplementärstrang abgebaut. Dennoch gibt es Hinweise, dass dieser nicht in allen Fällen funktionslos ist, sondern vielmehr gewebespezifisch seine Funktion entfaltet [55, 56].

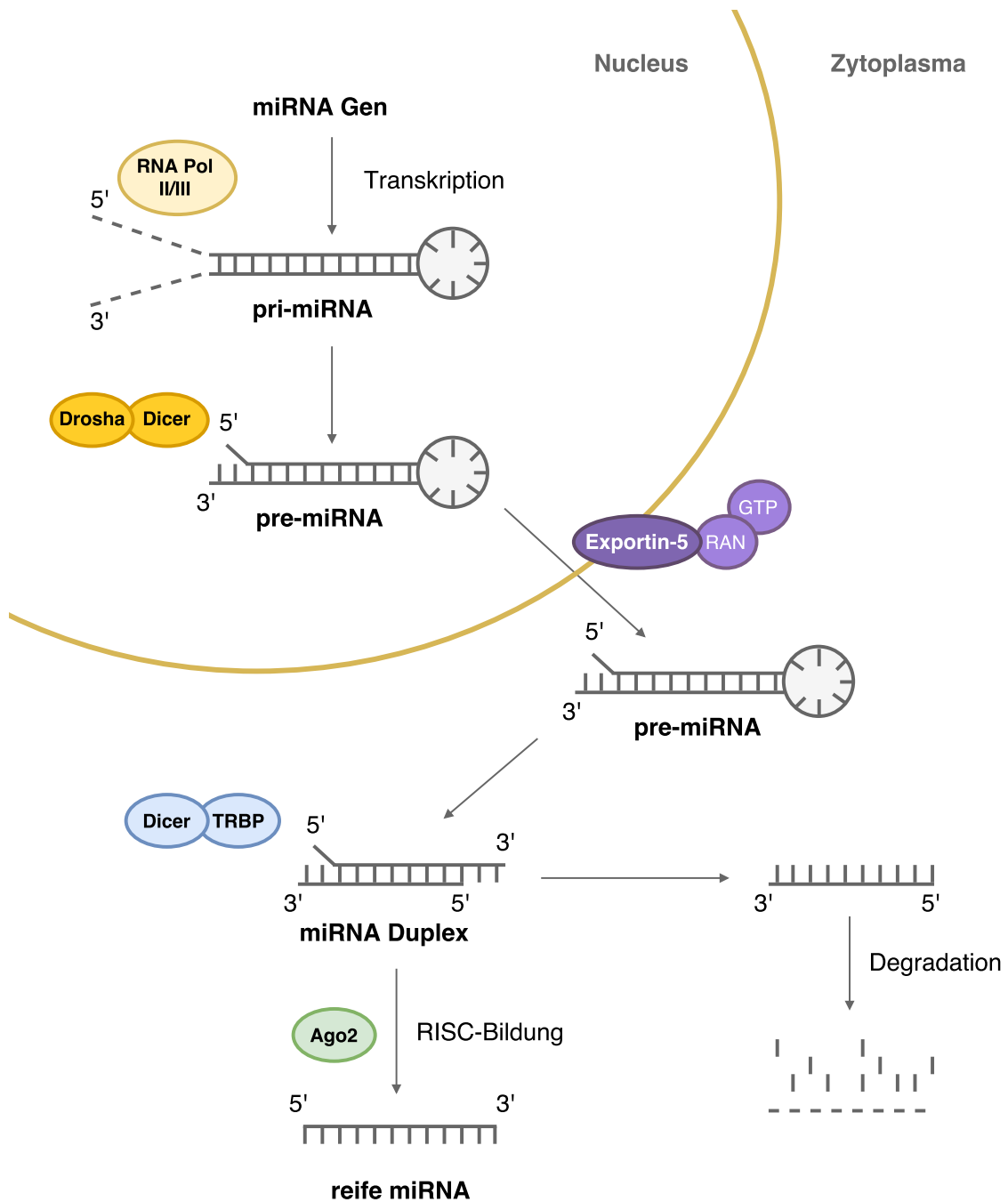


Abbildung 1.2: Biogenese und Prozessierung humaner miRNAs: nach der Transkription durch die RNA Polymerase II bzw. III wird die so entstandene pri-miRNA mittels eines Komplexes aus Drosha und dem Cofaktor DGCR8 zur pre-miRNA. Auf den Exportin-5 vermittelten Export aus dem Nucleus ins Zytoplasma folgt die Entfernung des *stem-loop* durch die RNase Dicer. Der doppelsträngige miRNA:miRNA* wird getrennt, wobei der funktionelle Strang zusammen mit Protein argonaute-2 (AGO2) in den RNA-induced silencing complex (RISC) geladen wird. Die miRNA vermittelt nun vor allem über die *seed-region* an ihrem 3'-Ende die Bindung an die entsprechende messenger RNA (mRNA) (Eigene Darstellung, in Anlehnung an [57])

1.3.3 Mechanismen des microRNA-regulierten Gen-Silencing

Der miRNA-Strang lagert sich nun an den RISC an, welcher im folgenden die Gen-Stilllegung (engl. *gene silencing*) bewirkt. Die Hauptkomponente dieses Protein-Komplexes ist Ago, ein Mitglied der Familie der Argonautenproteine [58]. Über die Domänen PAZ bzw. PIWI bindet Ago das 3'-Ende der miRNA, welches den RISC nun zur passenden mRNA führt [59]. Die Zielregion auf der mRNA befindet sich meist in deren 3'-UTR, in seltenen Fällen auch innerhalb des offenen Leserahmens oder der 5'-UTR (Abb. 1.3).



Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der typischen Struktur einer eukaryontischen mRNA. Die codierende Sequenz ist von der 5'-untranslatierten Region und der 3'-untranslatierten Region umgeben. Am 5'-Ende befindet sich die 5'Cap-Struktur. Das 3'-Ende wird vom Poly(A)-Schwanz gebildet (Eigene Abbildung)

Die miRNA reguliert ihre Ziele je nach Komplementarität zwischen miRNA und mRNA mittels zwei verschiedener Mechanismen: ① mRNA cleavage: besteht eine nahezu perfekte Komplementarität zwischen miRNA und mRNA, wird die mRNA direkt mithilfe des Argonaut-Proteins als Endonuklease zerschnitten. Der Schnitt erfolgt zwischen der Stelle, welche den Nukleotiden 10 und 11 der miRNA gegenüber liegt. Dieser Mechanismus hat weniger beim Menschen, sondern vor allem in Pflanzen eine große Bedeutung [60–62]. ② Der häufigere Mechanismus im Menschen besteht in einer direkten Hemmung der Translation der mRNA sowie durch Destabilisierung von mRNA [42]. Eine beinahe perfekte Komplementarität zwischen mRNA und miRNA wird hierbei meist nicht erreicht und ist auch nicht nötig. Vielmehr genügt es, wenn die miRNA am 5'-Ende im Bereich der Nukleotide 2-7 bzw. 2-8 komplementär ist, der sogenannten *seed-region* [47]. Dies bringt den Vorteil, dass eine einzelne miRNA nicht nur ein einzelnes Zielgen regulieren kann, sondern ganze Genexpressionsmuster beeinflussen kann.

In den meisten Fällen kommt es jedoch zur Destabilisierung von mRNA durch Deadenylation [63, 64]. Hierbei bindet das Argonaut-Protein des RISC ein Protein der GW182-Familie. Dieses interagiert direkt mit Poly(A)-Binding-Protein (PABP), welches sich an den Poly(A)-Schwanz der mRNA anlagert. Außerdem rekrutiert GW182 den Deadenylations-Komplex, dessen wichtigste Komponente – der CCR4–NOT-Komplex – daraufhin den Poly(A)-Schwanz der mRNA verkürzt. Ist eine bestimmte Länge des Poly(A)-Schwanzes unterschritten, führt dies zur Entfernung der Kappe am 5'-Ende der mRNA durch DCP1/DCP2 und dem 5'-3'-Abbau durch die Exonuklease XRN1 (Abb. 1.4) [65, 66]. Neuere Studien gehen davon aus, dass die beiden Vorgänge der Inhibierung der Translation und der mRNA-Degradation nicht in Konkurrenz zu einander stehen, sondern möglicherweise nacheinander ablaufen [67].

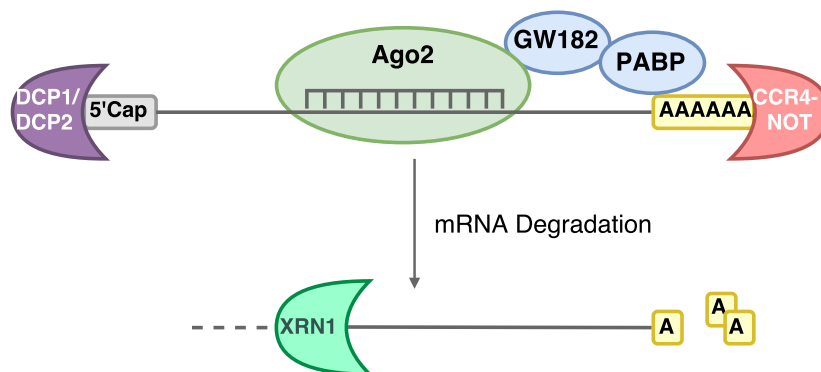


Abbildung 1.4: mRNA Degradation durch Deadenylierung: der RISC bindet über die miRNA an die mRNA und rekrutiert ein Protein aus der GW182-Familie, welches wiederum über PABP am Poly(A)-Schwanz der mRNA gebunden wird. Der so gebildete Deadenylierungskomplex führt mithilfe von weiteren Cofaktoren zur Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes der mRNA. Auf diese Weise wird die miRNA zur Degradation durch Exonukleasen freigegeben (Eigene Darstellung, in Anlehnung an [66])

Translations-gehemmte mRNAs und die zum Abbau nötigen Enzyme sowie Faktoren lassen sich in erhöhter Konzentration in bestimmten zytoplasmatischen Aggregaten eukaryotischer Zellen feststellen, den sogenannten *processing bodies*. Diese dynamischen Kompartimente unterschiedlicher Größe dienen sowohl zum

Abbau als auch zur Zwischenlagerung inhibierter mRNAs [68]. Dennoch konnte gezeigt werden, dass auch die Möglichkeit besteht, die dortigen mRNAs wieder der Translationsmaschinerie zuzuführen [69].

1.3.4 microRNA Umsatz

Große Teile der miRNA-Homöostase sind noch unverstanden und benötigen weiterer Aufklärung. Dennoch legt allein die Vielzahl an zellulären Prozessen in denen miRNAs involviert sind und den großen Einfluss auf die Genregulation den sie damit ausüben nahe, dass miRNAs selbst einer akkuraten Regulierung bedürfen. Dies geschieht mittels verschiedener Mechanismen sowohl auf Ebene der Transkription als auch auf Ebene der Prozessierung [70]. Trotz ihrer gewöhnlich guten Stabilität (miRNAs können meist noch Stunden bis Tage nach einer artifiziellen Inhibierung ihrer Biogenese nachgewiesen werden [71]), scheint der aktive Abbau reifer miRNAs [72] als auch die Stabilisierung durch Ziel-mRNAs homöostatisch wirksam zu sein [54].

1.3.5 Nomenklatur von microRNAs

Die stets größer werdende Anzahl von miRNAs aller möglichen Spezies verlangt eine möglichst übergreifende und einheitliche Klassifikation und Regeln zur Nomenklatur. Die Datenbank miRBase hat es sich zur Aufgabe gemacht miRNAs und deren zugehörige Gene zu katalogisieren und Richtlinien zur Annotation, Strukturierung und Benennung zur Verfügung zu stellen [48, 73–75].

Die miRBase-Nomenklatur hält sich an folgende Richtlinien: die Spezies bestimmt den Präfix der miRNA bestehend aus drei Buchstaben, beispielsweise *hsa* bei Menschen (*Homo sapiens*), *mmu* bei der Maus (*Mus musculus*) [76] (aus historischen Gründen sind die zuerst entdeckten miRNAs noch nach ihren Phänotypen benannt, wie z. B. *lethal-7 (let-7)*). Die reife miRNA kennzeichnet *hsa-miR-1*, wohingegen *hsa-mir-1* sich auf das entsprechende Gen sowie die

Tabelle 1.1: Nomenklatur von microRNAs

Nomenklatur	Bedeutung
hsa	<i>homo sapiens</i>
hsa-mir	pre-miRNA (Vorläufer-miRNA)
hsa-miR	reife miRNA
hsa-miR-X	miRNA X
hsa-miR-Xa/b	paraloge Sequenzen (maximal 2 Basen Unterschied)
hsa-miR-X-5p/3p	Abstammung von derselben pre-miRNA

Haarnadelstruktur des Primärtranskriptes bezieht. Der komplementäre Gegenstrang (-3p) zur reifen miRNA (-5p) wurde zunächst meist als nutzlos angesehen und mit einem * markiert, da man davon ausging, dass er nach der Trennung durch die Helikase der Degradierung unterlag. Nach neueren Erkenntnissen lässt sich in vielen Fällen durchaus eine biologische Funktion von ihm erwarten [56], woraufhin vorgeschlagen wurde, die Nomenklatur hin zu einer einheitlichen -5p (für den Führungsstrang) bzw. -3p (für den Komplementärstrang) Klassifikation zu verändern [48].

Grundsätzlich erfolgt die Namensgebung bei Entdeckung neuer miRNAs chronologisch mit fortlaufenden Nummern. Entstehen aus zwei verschiedenen pri-miRNA unterschiedlicher Genorte identische reife miRNAs werden diese mit einem weiteren numerischen Suffix versehen, beispielsweise hsa-mir-121-1 und hsa-mir-121-2. Unterscheidet sich die Basenabfolge nur in ein bis zwei Nukleotiden, wird dies mit hsa-mir-125a bzw. hsa-mir-125b gekennzeichnet [76]. Lässt sich bei reifen miRNAs eine Übereinstimmung in den Nukleotiden 2-8 der sog. Seed-Sequenz feststellen, werden diese zu einer miRNA-Familie zusammengefasst [54].

1.3.6 microRNA als Biomarker

Trotz ihrer Bildung, Prozessierung und ihrem primären Wirkungsort innerhalb der Zelle sind miRNAs auch in vielen anderen Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Plasma, Cerebrospinal-, Amnion-, Pleura- oder Peritonealflüssigkeit vorhanden.

Desweiteren sind miRNAs auch in Flüssigkeiten wie Speichel, Tränen, Urin, Muttermilch und Samenflüssigkeit nachweisbar, welche den Vorteil der nicht-invasiven Gewinnung mit sich bringen [77]. In jeder dieser Flüssigkeiten liegen die miRNAs in einer für die Flüssigkeit charakteristischen Zusammensetzung vor [77].

Studien haben gezeigt, dass „periphere“ miRNAs im Serum einer erstaunlichen Stabilität und Widerstandsfähigkeit unterliegen. Es konnte gezeigt werden, dass miRNAs im Serum selbst rauen Bedingungen wie Kochen oder extremen pH-Veränderungen trotzen können, bei denen normalerweise der Großteil der RNA zerstört werden würde [78]. Diese Stabilität kann teilweise dadurch erklärt werden, dass miRNAs mitunter in Exosomen – ca. 30-100 nm große Vesikel endozytären Ursprungs [79] – mittels Lipoproteine wie HDL [80] oder an andere Proteine wie AGO2 [81] gebunden transportiert werden. Auf diese Weise können sie an anderen Orten als ihrer Ursprungszelle – und somit Hormon-ähnlich – ihre Wirkung entfalten [78].

Die ersten tumor-spezifischen miRNAs wurden in Patienten mit diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom entdeckt. Hierbei korrelierte das Vorliegen bestimmter miRNAs positiv mit dem progressionsfreien Überleben [82]. Daraufhin folgten viele weitere Studien, welche ebenfalls miRNAs in Bezug auf Entstehung, Entwicklung und Verlauf onkologischer Erkrankungen untersuchten und diese zunehmend als potentielle Biomarker in den Fokus rückten [78]. Analysen von miRNAs ließen sogar mit großer Genauigkeit Rückschlüsse auf die Herkunft von Metastasen bei Krebs mit unbekanntem Primarius zu [83].

Auch bei neuropsychiatrischen Erkrankungen wie beispielsweise Schizophrenie [84], der bipolaren Erkrankung [85] oder neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer [86, 87] oder Chorea Huntington [88] ließen sich bereits derartige Veränderungen feststellen. Gerade im Bereich der psychiatrischen Krankheiten stellen aus dem Blut bestimmbare Biomarker ein enormes Potential dar, um Krankheiten zu erkennen, ihr Fortschreiten zu beurteilen oder die Prognose

abzuschätzen. Trotz großer Anstrengungen in den letzten Jahrzehnten, konnten noch keine herausragenden Fortschritte in diesem Gebiet verzeichnet werden [89]. miRNAs stellen somit einen neuen relevanten Ansatz dar. Der Bedarf eines Tests bzw. Biomarkers zeigt sich besonders im Bereich der psychischen Erkrankungen, deren Diagnose und Behandlung derzeit oftmals nur auf Beschreibungen von Symptomen, klinischen Beobachtungen sowie psychiatrischen Explorationen basieren. Dies kann unter Umständen viel Zeit in Anspruch nehmen, ist anfällig für Fehldiagnosen bzw. Fehlklassifikationen [89] und trägt möglicherweise auch zu den unzulänglichen Ansprechraten der medikamentösen Therapie bei.

1.3.7 microRNA-Veränderungen bei Angsterkrankungen

Die Rolle von miRNAs bei Angsterkrankungen im Menschen wurde im Vergleich zu anderen psychiatrischen Erkrankungen wie der Schizophrenie relativ wenig untersucht, was sich in der geringen Anzahl von Studien niederschlägt, die zu diesem Thema bis dato veröffentlicht wurden [90]. Im Jahr 2011 konnten mittels einer Fall-Kontroll-Studie zwei SNPs identifiziert werden (*rs6502892 tagging hsa-mir-22*, *rs11763020 tagging hsa-mir-339*), welche mit verschiedenen Panikstörung-Phänotypen assoziiert waren, wobei funktionelle Analysen der miRNAs auf eine post-transkriptionelle Inhibition diverser Kandidatengene von Panikstörungen hinweisen [91].

Außerdem scheint *rs41305272* innerhalb der miRNA-Bindungsstelle von *hsa-mir-330-3p* in *MAP2K5* potentiell mit Panikstörungen assoziiert zu sein (in einem euroamerikanischen/afroamerikanischen Patientenkollektiv mit komorbidem Substanzmissbrauch) [92].

Zwar sind keine miRNA-Expressionsstudien zu Angsterkrankungen verfügbar, jedoch wurde in zwei Untersuchungen an gesunden japanischen Medizinstudenten eine Erhöhung der Werte spezifischer miRNAs festgestellt (*miR-144/144** und

miR-16), die im Rahmen einer „aufreibenden“ akademischen Periode natürlichem Stress ausgesetzt waren [93, 94].

1.4 Fragestellung

Angsterkrankungen sind häufige Krankheitsbilder mit multifaktorieller Ätiologie. Neben Umwelt- und psychosozialen Faktoren besteht auch eine gewisse genetische Komponente mit einer Heritabilität in einem Bereich von 30-60 %, wobei am ehesten von einem komplexen Zusammenspiel verschiedenster Gene mit unterschiedlicher Relevanz auszugehen ist. Hierbei stellen miRNAs eine interessante Größe dar, da sie es vermögen, auf transkriptioneller Ebene Einfluss auf die Regulierung einer Vielzahl von Genen zu nehmen. Unter der Vorstellung einer Neurotransmitter-Dysregulation stellt der Noradrenalin-Transporter bzw. *SLC6A2* ein Kandidatengen dar.

In ersten Teil der Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, welche potentiellen miRNA-Regulatoren von *SLC6A2* *in silico* indentifiziert werden können, um diese dann in einem weiteren Schritt *in vitro* zu überprüfen.

In zweiten Teil der Arbeit soll schließlich der Frage nachgegangen werden, ob bzw. in welchem Maß Einzelbasenpolymorphismen im Bereich der zuvor ermittelten miRNA-Gene (sowie eines SNP innerhalb der 3'-UTR von *SLC6A2*) mit dem Vorliegen einer Angsterkrankung assoziiert sind und hinsichtlich der Merkmalsausprägung ‚Angst‘ im Sinne der ASI- und ACQ-Summenscores korrelieren.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Medien, Puffer und Lösungen

Ergänztetes Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM^{+/+}) 500 mL Dulbecco's Modified Eagle-Medium (DMEM) mit 4,5 g/L Glukose wurde mit 50 mL fetalem Kälberserum, 5 mL 200 mM L-Glutamin (P04-80100) und 5 mL Penicillin-Streptavidin (10 000 U Penicillin/mL, 10 mg Streptavacin/mL) (P4333) versetzt (PANTM-Biotech, Aidenbach)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM^{-/-}) 500 mL DMEM mit 4,5 g/L Glukose ohne ergänzende Komponenten (PANTM-Biotech, Aidenbach)

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 500 mL PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (D8537, Sigma Aldrich, Deisenhofen); Lagerung bei 4 °C

Trypsin/EDTA-Lösung 0,5 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (P10-023100, PANTM-Biotech, Aidenbach); Lagerung bei -20 °C

2.1.2 Transfektionsreagenzien

HEK293AD-Zelllinie Humane embryonale Nierenzellen, welche mit Adenovirus Typ 5 DNA transformiert wurden [95]. Sie sind durch eine gute Adhärenz und vergleichsweise robustes Wachstum gekennzeichnet.

miRNAs Die verwendeten *mirVanaTM miRNA Mimics* (ambion[®] life technologiesTM, Carlsbad, Kalifornien, USA) sind kurze, chemisch modifizierte dop-

pelsträngige RNA-Moleküle, die endogene miRNAs imitieren. Sie wurden lyophilisiert geliefert und zunächst entsprechend den Herstellerangaben in nucleasefreiem, sterilem Wasser suspendiert und gelagert. Die eingesetzten miRNAs sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Neben den humanen miRNAs wurde die pflanzliche miRNA mir-ath-159a der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) zur Kontrolle eingesetzt.

Attractene Transfection Reagent ist ein nicht-liposomales Lipid und wurde für die transiente Co-Transfektion der HEK293AD-Zellen nach Angaben des Herstellers verwendet (QUIAGEN®, Venlo, Niederlande).

Steriles, RNase freies Wasser (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)

Vektoren Sowohl der Reportervektor (HmiT017397-MT01), welcher die 3'-UTR von *SLC6A2* enthält, als auch der Kontrollvektor (CmiT000001-MT01) wurden von der Firma GeneCopoeia™ (Rockville, MD, USA) bezogen. Beide enthalten das duale Luciferase Konstrukt.

Tabelle 2.1: Übersicht der in der Arbeit verwendeten miRNAs (inklusive der pflanzlichen Kontroll-miRNA). Neben der miRBase Accession ist zudem die Sequenz der jeweiligen miRNA angegeben

miRNA	miRBase Accession	Sequenz
hsa-miR-129-5p	MIMAT0000242	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC
hsa-miR-1303	MIMAT0005891	UUUAGAGACGGGUCUUGCUCU
hsa-miR-146a-3p	MIMAT0004608	CCUCUGAAAUUCAGUUCUUCAG
hsa-miR-198	MIMAT0000228	GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUC
hsa-miR-3155b	MIMAT0019012	CCAGGCUCUGCAGUGGGA
hsa-miR-3200-5p	MIMAT0017392	AAUCUGAGAAGGCGCACAAGGU
hsa-miR-330-5p	MIMAT0004693	UCUCUGGGCCUGUGUCUUAGGC
hsa-miR-361-5p	MIMAT0000703	UUAUCAGAAUCUCCAGGGGUAC
hsa-miR-3616-3p	MIMAT0017996	CGAGGGCAUUUCAUGAUGCAGGC
hsa-miR-3619-5p	MIMAT0017999	UCAGCAGGCAGGCUGGUGCAGC
hsa-miR-3622b-5p	MIMAT0018005	AGGCAUGGGAGGUCAGGUGA
hsa-miR-362-3p	MIMAT0004683	AACACACCUAUUCAAGGAUUA
hsa-miR-3661	MIMAT0018082	UGACCUGGGACUCGGACAGCUG
hsa-miR-3665	MIMAT0018087	AGCAGGUGCGGGGCGGCG
hsa-miR-3689a-3p	MIMAT0018118	CUGGGAGGUGUGAUUCCUGGU

2 Material und Methoden

Fortsetzung von Tabelle 2.1

miRNA	miRBase Accession	Sequenz
hsa-miR-378g	MIMAT0018937	ACUGGGCUUGGAGUCAGAAG
hsa-miR-3921	MIMAT0018196	UCUCUGAGUACCAUAUGCCUUGU
hsa-miR-3925-5p	MIMAT0018200	AAGAGAACUGAAAGUGGAGCCU
hsa-miR-3943	MIMAT0018359	UAGCCCCCAGGCUUCACUUGGCG
hsa-miR-4268	MIMAT0016896	GGCUCUCCUCUCAGGAUGUG
hsa-miR-4290	MIMAT0016921	UGCCUCCUUUCUCCUC
hsa-miR-4435	MIMAT0018951	AUGGCCAGAGCUCACACAGAGG
hsa-miR-4450	MIMAT0018971	UGGGGAUUUGGAGAAGUGGUGA
hsa-miR-4471	MIMAT0018998	UGGGAACUUAGUAGAGGUUUA
hsa-miR-4653-5p	MIMAT0019718	UCUCUGAGCAAGGCUUAACACC
hsa-miR-4668-5p	MIMAT0019745	AGGGAAAAAAAAAAGGAUUUGUC
hsa-miR-4706	MIMAT0019806	AGCGGGGAGGAAGUGGGCGUCUU
hsa-miR-4713-3p	MIMAT0019821	UGGGAUCCAGACAGUGGGAGAA
hsa-miR-4715-3p	MIMAT0019825	GUGCCACCUUAACUGCAGCCAAU
hsa-miR-4728-5p	MIMAT0019849	UGGGAGGGGAGAGGCAGCAAGCA
hsa-miR-4733-5p	MIMAT0019857	AAUCCCAAUGCUAGACCCGGUG
hsa-miR-4749-5p	MIMAT0019885	UGCGGGGACAGGCCAGGGCAUC
hsa-miR-4773	MIMAT0019928	CAGAACAGGAGCAUAGAAAGGC
hsa-miR-4778-5p	MIMAT0019936	AAUUCUGUAAAGGAAGAAGAGG
hsa-miR-4781-5p	MIMAT0019942	UAGCGGGGAUCCAAUAUUGG
hsa-miR-4786-3p	MIMAT0019955	UGAAGCCAGCUCUGGUCUGGGC
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	CCUCCACACCCAAGGCUUGCA
hsa-miR-548p	MIMAT0005934	UAGCAAAAACUGCAGUUACUUU
hsa-miR-579-3p	MIMAT0003244	UUCAUUUGGUUAAAACCGGAUU
hsa-miR-600	MIMAT0003268	ACUUACAGACAAGAGCCUUGCUC
hsa-miR-631	MIMAT0003300	AGACCUGGCCAGACCUCAGC
hsa-miR-664b-3p	MIMAT0022272	UUCAUUUGCCUCCAGCCUACA
hsa-miR-718	MIMAT0012735	CUUCCGCCCGCCGGGCGUCG
hsa-miR-761	MIMAT0010364	GCAGCAGGGUGAAACUGACACA
mir-ath-159a	MIMAT0000177	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA

Ende von Tabelle 2.1

2.1.3 Reagenzien für Luciferase-Assay

Verwendet wurde das Luc-Pair™ miR Luciferase Assay von GeneCopoeia™ (Rockville, MD, USA), bestehend aus:

- Luc-Pair miR Luciferase Assay Solution I (10 mL), Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zelllyse und Puffer der *Firefly Luciferase*)
- Luc-Pair miR Luciferase Substrate I (500 μL), Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

(Substrat der *Firefly Luciferase*)

- Luc-Pair miR Luciferase Assay Solution II (10 mL), Lagerung bei Raumtemperatur
(Puffer der *Renilla Luciferase*)
- Luc-Pair miR Luciferase Substrate II (500 µL), Lagerung bei -20 °C
(Substrat der *Renilla Luciferase*)

Zur Herstellung der *Working Solution I* wurden *Assay Solution I* und *Substrate I* auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde *Substrate I* in einem Verhältnis von 1:40 in *Assay Solution I* verdünnt. Zur Herstellung der *Working Solution II* wurde analog dazu verfahren, jedoch auf ein Verhältnis von 1:200 verdünnt.

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

- PCR-Gefäße 0,2 mL (Hartenstein, Würzburg)
- Safe-Lock Tubes 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg)
- Combitips advanced® 5,0 mL, Eppendorf Quality™ (Eppendorf, Hamburg)
- Combitips advanced® 5,0 mL, Eppendorf Biopur® (Eppendorf, Hamburg)
- gestopfte RNase/DNase, Pyrogen- und DNA-freie Pipettenspitzen (nerbe plus, Winsen)
- BD Falcon™ Conical Tubes 10 mL und 50 mL (BD Biosciences, Heidelberg)
- Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrene Plate, Nr. 236105 (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)
- Nunc™ Zellkulturbehandelte EasYFlasks™, 75 cm², Nunclon Delta-treated, Nr. 156472 (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)
- Millipore Express® PLUS Membranfilter 0,22 µm (EMD Milipore, Darmstadt)

2.1.5 Software

- Wallac Envision Manager (Perkin Elmer, Hamburg)
- Microsoft® Excel® für Mac
- IBM® SPSS® Statistics Version 24

2.2 Methoden

Eine Übersicht der einzelnen, in den folgenden Abschnitten wiedergegebenen Schritte ist in Abb. 2.1 dargestellt.

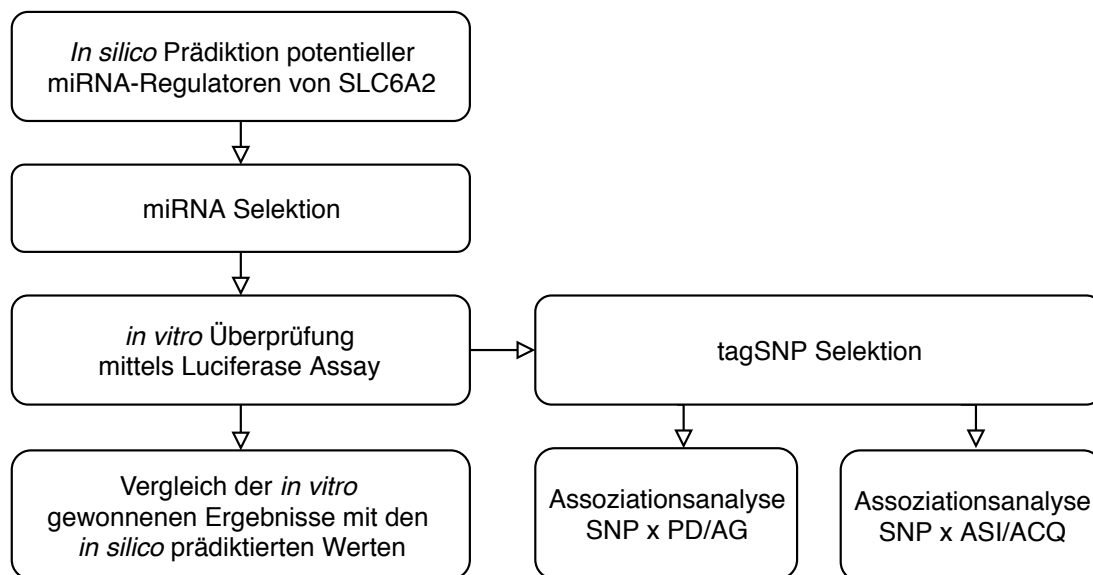


Abbildung 2.1: Flussdiagramm der in der Arbeit angewendeten Vorgehensweise.

Anschließend an die computergestützte Prädiktion von potentiellen miRNA-Regulatoren von *SLC6A2* wurden miRNAs zur weiteren experimentiellen Validierung mittels dualem Luciferase-Assay ausgewählt und die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse mit den *in silico* prädiktierten Werten verglichen. In einem zweiten Teil wurden ausgehend von den zuvor gewonnenen Ergebnissen sogenannte SNPs ermittelt und mittels Assoziationsanalysen untersucht.

2.2.1 Prädiktion potentieller microRNA-Regulatoren von *SLC6A2*

Aufgrund der großen Anzahl mittlerweile beschriebener miRNAs und der weitaus größeren Anzahl entsprechender Zielstrukturen [96], wäre es selbst mit größtem Arbeits- und Kostenaufwand kaum möglich, alle möglichen Interaktionen aufzudecken und zu quantifizieren. Um diese Problematik zu überwinden, wurden verschiedene bioinformatische Methoden entwickelt, mit dem Ziel potentielle Interaktionen von miRNAs und deren Ziel-mRNA zu detektieren. Dazu stehen diverse Datenbanken zur Verfügung, welche sich durch verschiedene Algorithmen unterscheiden und bis dato noch in vielen Fällen relativ inhomogene Vorhersagen

ausgeben [97, 98]. Im Folgenden wird kurz auf die grundlegenden Prinzipien der miRNA-mRNA-Interaktion eingegangen, mittels welcher die Prädiktionen von Ziel-mRNA anhand miRNA und *vice versa* erfolgt.

Sequenz-Komplementarität Am 5'-Ende der miRNA liegt eine Region, welche sich über die Nukleotide 2-7 erstreckt und mittels Watson-Crick-Basenpaarung an die mRNA-Zielregion binden kann, und als *seed* bezeichnet wird. Die komplementäre Bindungsregion an der mRNA wird als *seed site* bezeichnet. Sie ist das entscheidende Element in der Prädiktion von miRNA-Targets [99]. Je nach Anzahl der komplementären Basenpaarungen in dieser Region, werden 8mer, 7mer-m8, 7mer-A1 und 6mer *seed sites* unterschieden, welche in Abbildung 2.2 dargestellt sind. Die Effektivität der Paarung geht einher mit der Anzahl der gepaarten Basen [100]. Ein Adenin in der *seed site* an der korrespondierenden Position 1 der miRNA gilt als besonders günstig für die Effizienz der Zielerkennung [47]. Trotzdem können auch kleine Abweichungen wie eine einzelne Wobble-Paarungen in der *seed site* toleriert werden [101]. Doch auch Bereiche außerhalb der *seed site* der mRNA können eine Rolle spielen, indem sie eine Bindung über wenige Nukleotide mit dem 3'-Ende der miRNA eingehen, und so zusätzlich die Affinität erhöhen (*supplementary pairing*) bzw. eine nicht-perfekte Komplementarität in der Seed-Region kompensieren [99].

Konservierung Da Regionen in der 3'-UTR von mRNAs, welche einen hohen Grad an Konservierung aufweisen, mit höherer Wahrscheinlichkeit funktionell bedeutsam sind, können diese als potentielle miRNA-Targets betrachtet werden und die Rate an falsch-positiven Prädiktionen senken [102]. Dennoch existieren auch eine beträchtliche Anzahl an nicht-konservierten, Spezies-spezifischen miRNAs und mRNAs [103].

Thermodynamische Stabilität Eine weitere Komponente der Prädiktion von mi-

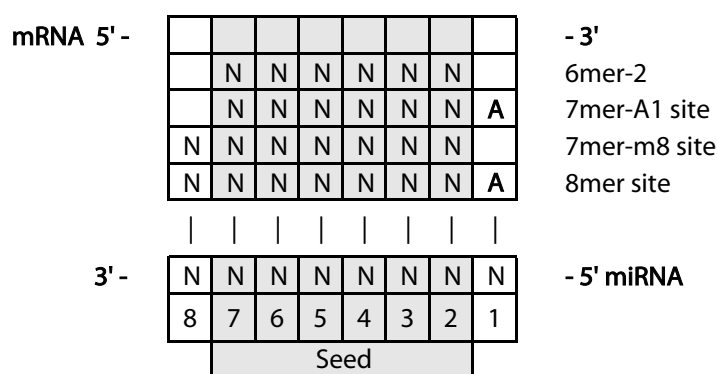


Abbildung 2.2: Die Nukleotide der miRNA sind vom 5'-Ende ausgehend mit Nummern versehen. 6, 7 bzw. 8mer beschreibt die Anzahl der komplementären Basen zwischen der miRNA und ihrer Zielsequenz. 7mer-A1 beschreibt eine Übereinstimmung der Seed-Region + Adenin in Position 1. Bei einer 7mer-m8-site findet sich zusätzlich zur übereinstimmenden Seed-Region eine Übereinstimmung an Position 8. Die 8mer-site weist ein Adenin an Position 1 sowie Komplementarität an Position 8 auf.

RNA-Zielstrukturen ist die Miteinbeziehung der thermodynamischen Stabilität. Aus energetischer Sicht ist der hybridisierte Zustand zweier komplementärer RNA-Stränge günstiger. Je niedriger die freie Energie dieser gepaarten Stränge ist, desto mehr Energie wird benötigt, um diese zu trennen – dementsprechend ist die Affinität einer miRNA zu einer mRNA umso größer, je niedriger die freie Energie des so gebildeten Duplex ist [104].

Zugänglichkeit Berücksichtigung findet zudem die Sekundärstruktur, welche die mRNA nach der Transkription einnimmt. Damit sich die miRNA anlagern kann, müssen Abschnitte der mRNA auf Kosten der freien Energie geöffnet werden [105]. Vorteilhaft scheint es zu sein, wenn kurze flankierende Regionen stromaufwärts und -abwärts der *seed site* ebenfalls geöffnet sind [106], was beispielsweise besonders in Bereichen mit einem hohen A:U-Anteil der Fall ist, und so zu einer erleichterten Zugänglichkeit führen kann [100].

Auch die Position der *seed site* innerhalb der 3'-UTR der mRNA hat Einfluss auf die Funktion. Sie sollte mindestens 15 nt vom Stoppkodon entfernt sein, ohne jedoch bei langen 3'-UTR zu sehr zentral zu liegen, um eine optimale

Anlagerung der RISC zu ermöglichen [100].

Kooperativität Nah beieinander gelegene *seed sites* können zu synergistischen Effekten führen, wobei ein Abstand von 17 bis 35 nt als optimal gilt. Der genau zugrunde liegende Mechanismus ist noch unklar; es wird davon ausgegangen, dass sich auf diese Weise angrenzende RISC gegenseitig stabilisieren können und so den Regulationsprozess beschleunigen [100].

Zur Detektion potentieller miRNAs, die mit *SLC6A2* interagieren, wurde auf drei online verfügbare Datenbanken mit entsprechend jeweils unterschiedlichen Algorithmen zurückgegriffen. Die so erhaltenen miRNA-Prädiktionen der drei Datenbanken wurden konsolidiert und, wie in Tabelle 3.1 auf Seite 46 dargestellt, zusammengefasst.

2.2.1.1 TargetScan 6.2

Der von TargetScan verwendete Algorithmus sucht nach perfekter Komplementarität in der Seed-Region und darüber hinaus. Zusätzliches *supplementary pairing* am 3'-Ende der miRNA vermindert die Anzahl der falsch-positiven Vorhersagen, zudem findet der Grad der Konservierung Berücksichtigung [47]. TargetScan erlaubt dem Benutzer nach miRNA, Genen und miRNA-Familien verschiedener Konservierungsgrade zu suchen. Die Ergebnisse werden mittels eines sogenannten „context+ score“ eingeordnet [107].

Auf der TargetScan-Webseite besteht neben einer grafischen Benutzeroberfläche zur Suche nach miRNA bzw. Zielgenen die Möglichkeit, den gesamten Datensatz herunterzuladen. Dieser wurde anschließend nach „SLC6A2“ durchsucht (TargetScan unterscheidet hierbei zwischen den folgenden vier Transkriptvarianten NM_001043, NM_001172501, NM_001172502 und NM_001172504. In der vorliegenden Arbeit wurden alle vier berücksichtigt, Duplikate wurden entfernt). Die so erhaltenen miRNAs wurden anhand des TargetScan-eigenen „context+

Score“ sortiert. Dieser ist die Summe der folgenden Merkmale: Art der Seed-Komplementarität, Komplementarität am 3'-Ende der miRNA, Zugänglichkeit und thermodynamische Stabilität [107]. Um die Rate an falsch positiven miRNAs gering zu halten, welche im folgenden experimentell überprüft werden sollten, wurde ein Cut-off-Wert von -0,275 festgelegt.

2.2.1.2 DIANA microT-CDS

DIANA microT-CDS stellt im Internet eine Benutzeroberfläche zur Verfügung, mit der sich die, aus experimentellen Daten und durch selbst-lernende Algorithmen verarbeiteten, Daten zur Identifizierung von potentiellen miRNA-Zielstrukturen durchsuchen lassen. Hierbei finden Parameter wie die freie Energie des Duplex, AU-reiche Regionen, Konservierung und viele weitere Berücksichtigung.

Mittels der Webapplikation wurde die Datenbank nach dem humanen *SLC6A2*-Gen durchsucht (Ensemble Gene ID: ENSG00000103546) und die Ergebnisse anschließend exportiert. Als Cut-off-Wert wurde ein „miTG score“ von 0,755 festgelegt.

2.2.1.3 miRDB 4.0

miRDB stellt auf seiner Webseite eine Suchmaske zur Verfügung mit welcher nach potentiellen Zielstrukturen von miRNAs gesucht werden kann. Diese Daten wurden, nach Angaben des Anbieters, mittels zahlreicher Hochdurchsatz-Sequenzierungen und moderner Methoden des maschinellen Lernens ermittelt, und auf ihre Fähigkeit hin entsprechende Gene zu beeinflussen, gewichtet. Der eingesetzte sogenannte MiRanda-Algorithmus erkennt Zielstrukturen anhand der Parameter „Sequenz-Komplementarität“ und „thermodynamische Stabilität“ [108].

Über die miRDB-Webseite wurde die Datenbank nach dem Gensymbol *SLC6A2* durchsucht; die Resultate wurden exportiert und anhand des miRDB-eigenen „Target Score“ sortiert. Als Cut-off wurde ein „Target Score“ von 70 festgelegt.

2.2.2 Genexpressionsanalysen

2.2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die verwendeten gestopften Glaspipetten wurden vor Gebrauch durch Hitzebehandlung sterilisiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Die adhärent als Monolayer wachsenden HEK293AD-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 75 cm² in einem Begasungsschrank bei 37 °C und 7 % CO₂-Atmosphäre und DMEM^{+/+} kultiviert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 60 % erreicht hatten, wurden sie passagiert. Dazu wurde das nun mit Stoffwechselprodukten belastete Medium abgesaugt. Dieses enthält unter anderem fetales Kälberserum, worin diverse Proteaseinhibitoren enthalten sind, welche die spätere Trypsin-Reaktion inhibieren würden. Dies wurde verhindert, indem die Zellen mit ca. 10 mL angewärmter PBS vorsichtig gewaschen wurden.

Um die Adhärenz der Zellen herabzusetzen, wurden sie anschließend mit 10 mL Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt und 1-2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um zytotoxische Effekte zu vermeiden, wurde versucht, diese Zeit so kurz wie möglich jedoch so lang wie nötig zu halten. Bei ausreichender Ablösung wurde durch Zugabe von 8 mL Nährmedium die Trypsin-Enzymreaktion gestoppt. Um einer Verklumpung der Zellen vorzubeugen, wurden sie mehrmals mit einer Pipette vereinzelt und anschließend in eine (15 mL) Schraubröhre zur Weiterzucht bzw. zur Transfektion überführt.

Für die Transfektionen wurden davon ausgehend pro 96-*well* Platte 2 mL dieser Zellsuspension in eine weitere Schraubröhre überführt und mit jeweils 8 mL Nährmedium ergänzt, wovon anschließend 100 µL in jedes Nöpfchen der 96-*well* Platte pipettiert wurden. Daraufhin erfolgte eine 4-6 stündige Inkubation bei 37 °C.

2.2.2.2 Transiente Co-Transfektion

Lag nach der 4-6 stündigen Inkubation eine ausreichende Konfluenz und Adhärenz der Zellen auf der Mikrotiterplatte vor, wurde mit der Co-Transfektion begonnen. Um zu berücksichtigen, dass miRNAs möglicherweise nach der Transfektion auch an anderen Stellen als der 3'-UTR von *SLC6A2* des Reportervektors HMI (Abb. 2.4) binden, wurden zusätzlich alle Versuche auch mit einem Kontrollvektor CMI durchgeführt, bei sonst gleich bleibenden Konzentrationen und Mengen von Medium, Attractene und miRNA. CMI gleicht dem HMI im Aufbau, enthält jedoch *nicht* die 3'-UTR von *SLC6A2*. Die anschließende Co-Transfizierung erfolgte in Triplikaten auf dieselbe 96-well Platte, um Störeinflüsse durch variierende Versuchsbedingungen zu minimieren (Abb. 2.3). Für jedes Transfektions-Triplet (vgl. Abb. 2.3) wurde ein eigener Ansatz zubereitet, welcher sich wie folgt zusammensetzt:

- 15,8 µL Vektorverdünnung, bestehend aus
 - 1,4 µL Reportervektor HMI bzw. Kontrollvektor CMI
 - 14,4 µL DMEM pur
- 4,2 µL der jeweiligen miRNA / der pflanzlichen Kontroll-miRNA *mir-ath-159a* / RNase freiem Wasser

Anschließend wurde zu jedem Ansatz 15 µL Attractene-Verdünnung (0,525 µL Attractene auf 14,475 µL DMEM pur) zugegeben und 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden jeweils 10 µL/Näpfchen des Transfektions-Ansatzes in Triplikaten zu den HEK293AD-Zellen gegeben und für 48 Stunden bei 37 °C und 7% CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Beim sogenannten *edge effect* kommt es vermutlich durch Temperaturunterschiede am Rand zu ungünstigen Verdunstungserscheinungen, welche mit einem unregelmäßigen Zellwachstum in der Peripherie einhergehen. Um dieses Phäno-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		m1	m2	m3	m4	ATH	H ₂ O	m5	m6	m7	m8	
CMI		m1	m2	m3	m4	ATH	H ₂ O	m5	m6	m7	m8	
D		m1	m2	m3	m4	ATH	H ₂ O	m5	m6	m7	m8	
E		m1	m2	m3	m4	ATH	H ₂ O	m5	m6	m7	m8	
HMI		m1	m2	m3	m4	ATH	H ₂ O	m5	m6	m7	m8	
F		m1	m2	m3	m4	ATH	H ₂ O	m5	m6	m7	m8	
G		m1	m2	m3	m4	ATH	H ₂ O	m5	m6	m7	m8	
H												

Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Layouts der 96-well Platte. Die Rand-Näpfcchen wurden für die Transfektion ausgespart. Die hellgrau hinterlegten Näpfcchen (B2-D11) wurden mit einem Kontrollvektor (CMI) transfiziert, der nicht die 3'-UTR von SLC6A2 enthält. Die dunkelgrau hinterlegten Näpfcchen (E2-G11) wurden mit einem Vektor transfiziert, welcher die 3'-UTR von SLC6A2 enthält (HMI). Neben den verschiedenen verwendeten miRNAs (m1 bis m8) wurden zur Normalisierung jeweils Triplets mit H₂O anstelle von miRNA angelegt (B7-D7 und E7-G7). Als Negativkontrolle wurde die pflanzliche miRNA *mir-ath-159a* eingesetzt (ATH: B6-D6 und E6-G6).

men zu vermeiden und die Homogenität der Messungen zu verbessern, wurden die Rand-Näpfcchen der Mikrotiterplatte von der Transfektion ausgespart.

2.2.2.3 Prinzip des Luciferase Assay

Zur Validierung der Interaktion der in Abschnitt 2.2.1 *in silico* prädiktierten miRNAs mit SLC6A2 wurden Luciferase Assays durchgeführt. Mittels eines Luciferase Assay ist es möglich, *in vitro* die Wirksamkeit von miRNAs als posttranskriptionelle Regulatoren der SLC6A2-Expression zu messen. Dies geschieht mithilfe von Luciferasen – Enzymen bei deren katalytischer Aktivität es zu Biolumineszenz kommt, wobei die Intensität des emittierten Lichtes in einem linearen Zusammenhang mit der Menge an Luciferase steht und mittels Luminometer quantifiziert werden kann („Luc-Pair™ Manual“, Fig. 4). Im Luc-Pair™ miR Luciferase Assay von GeneCopoeia™ kommen die beiden folgenden Luciferasen zum Einsatz:

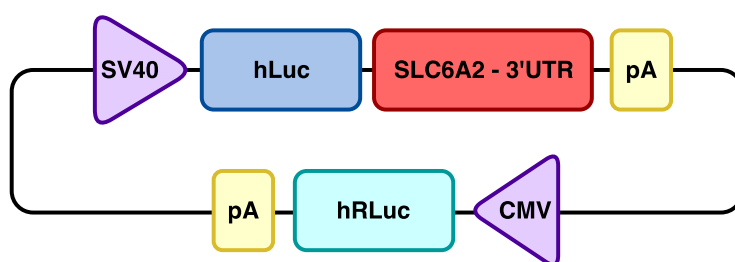


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des verwendeten Vektors. Die Expression der *Firefly Luciferase* (hLuc) wird durch den SV40-Promotor getrieben. Stromabwärts des hLuc Gens ist die 3'-UTR von SLC6A2 kloniert. Weiter stromabwärts befindet sich die als Referenz-Enzym implementierte *Renilla Luciferase* (hRLuc). Sie wird von einem eigenen CMV-Promotor getrieben (Eigene Darstellung, in Anlehnung an GeneCopoeia™ <https://genecopoeia.com/product/mirna-target-clones/mirna-targets>)

Firefly Luciferase Sie stammt aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* und ist ein zytoplasmatisches Enzym mit einer Molekülmasse von 61 kDa und gilt als idealer Reporter, um sowohl die Promoteraktivität als auch die posttranskriptionellen Regulierungen abhängig von der Genexpression zu überwachen. Folgende Reaktion wird katalysiert:



Die *Firefly Luciferase* wurde vom Hersteller GeneCopoeia™ bereits in den Luciferase-Vektor kloniert, um als Reporter-Enzym zu fungieren. Die Expression der Luciferase wird durch einen eigenen SV40-Promotor getrieben, stromabwärts davon befindet sich die 3'-UTR von *SLC6A2* (Abbildung 2.4). Dies führt dazu, dass die daraus gebildeten Transkripte sowohl die 3'-UTR von *SLC6A2* als auch die *Firefly Luciferase* enthalten. Bindet nun eine miRNA an eine geeignete *target site* der 3'-UTR, kommt es zur Inhibierung der Translation bzw. Degradation der mRNA (vgl. Kapitel 1.3.3) und somit zu einer verminderten Aktivität der *Firefly Luciferase* (Abbildung 2.5).

Renilla Luciferase stammt ursprünglich aus der Koralle *Renilla reniformis* und hat eine Molekülmasse von 36 kDa. Sie unterliegt keiner posttranskriptionellen Prozessierung und kann so direkt nach der Translation als „genetischer

Reporter“ fungieren. Folgende Reaktion wird katalysiert:



Die *Renilla Luciferase* dient als Referenz-Enzym und befindet sich auf demselben Luciferase-Vektor wie das Reporter-Enzym (Abbildung 2.4). Sie wird von einem eigenen CMV-Promotor getrieben und konstitutiv exprimiert. Dementsprechend unterliegt sie nicht dem Einfluss der miRNAs. Dies ermöglicht eine anschließende Normalisierung auf die tatsächliche Menge an exprimiertem Vektor.

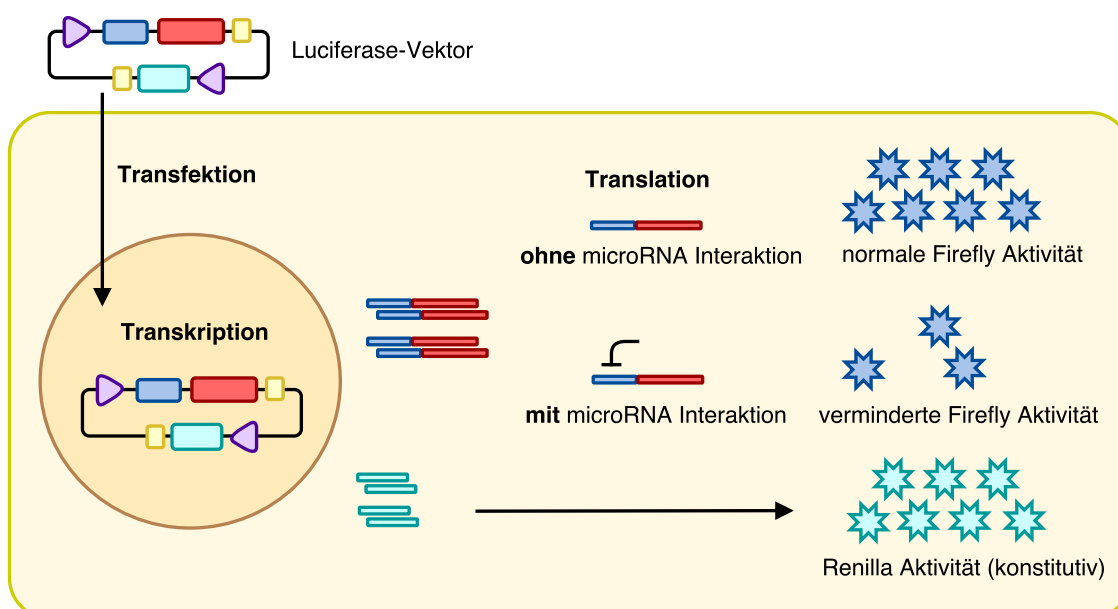


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Luciferase-Assay Prinzips. Mittels Transfektion gelangt der Vektor, welcher sowohl das Reporter- als auch das Referenz-Enzym enthält, in die Zelle. Da die Expression der 3'-UTR an die Expression der *Firefly Luciferase* gekoppelt ist und der Regulation von miRNA untersteht, lässt sich im Fall einer miRNA-Interaktion eine verminderte *Firefly Luciferase*-Aktivität feststellen. Die Expression der *Renilla Luciferase* ist konstitutiv, wodurch deren Aktivität zur Normalisierung verwendet werden kann (Eigene Darstellung, in Anlehnung an GeneCopoeia™ <https://genecopoeia.com/product/mirna-target-clones/mirna-targets>)

Die beiden verwendeten Luciferasen eignen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Strukturen und Substrate optimal als Co-Reporter, da ihre katalysierten Reaktionen dadurch unabhängig voneinander ablaufen können. Damit die Aktivitäten der Luciferasen getrennt voneinander gemessen werden können, muss

zunächst ein Reagenz (Working Solution I) hinzugegeben werden, welches die Zellen lysiert und als Substrat für die *Firefly Luciferase* dient. Nach Messung der *Firefly Luciferase*-Lumineszenz wird ein weiteres Reagenz (Working Solution II) hinzugegeben, welches die *Firefly Luciferase*-Aktivität beendet und als Substrat für die *Renilla Luciferase* dient, sodass nun die Aktivität der *Renilla Luciferase* ermittelt werden kann.

2.2.2.4 Durchführung des Luciferase Assay

48 Stunden nach der Co-Transfektion der HEK-Zellen, wurden diese aus dem Inkubator geholt, um die Lumineszenz-Messungen durchzuführen. Dazu wurden alle Näpfcchen abgesaugt und jeweils 70 μL /Näpfcchen der GeneCopoeia™ Substrate Solution I hinzugegeben, welche zuvor lichtgeschützt auf Zimmertemperatur erwärmt wurde.

Da der Hersteller eine Messung nach ca. 10 Minuten empfiehlt, wurde mit der Lumineszenz-Messung der *Firefly Luciferase* mittels des 2104 Envision Multilabel Reader nach einer fünfminütigen Inkubationszeit begonnen. Um Diskrepanzen im zeitlichen Verlauf der Reaktion besser beurteilen zu können, wurden insgesamt 11 Messungen im Abstand von 120 Sekunden durchgeführt. Nach Ablauf der Messrunde wurde 70 μL /Näpfcchen der *Substrate Solution II* zugegeben, um die Reaktion der *Firefly Luciferase* zu beenden und die der *Renilla Luciferase* zu starten. Erneut wurden nach 5 Minuten 11 Messungen im Abstand von 120 Sekunden durchgeführt.

Um die Wirksamkeit der Expressions-Inhibierung durch die miRNAs vergleichbar zu machen, wurden folgende Mittelungen und Normalisierungen durchgeführt:

1. Zur Erfassung der linear abnehmenden Gesamtaktivität wurden die Aktivitäten zwischen den Messungen zu den Zeitpunkten nach 9 Minuten und 15 Minuten herangezogen (Abb. 2.6) und für jedes Näpfcchen der Mittelwert

der Firefly-Aktivität (F_{9-15}) bzw. Renilla-Aktivität (R_{9-15}) in diesem Zeitraum berechnet.

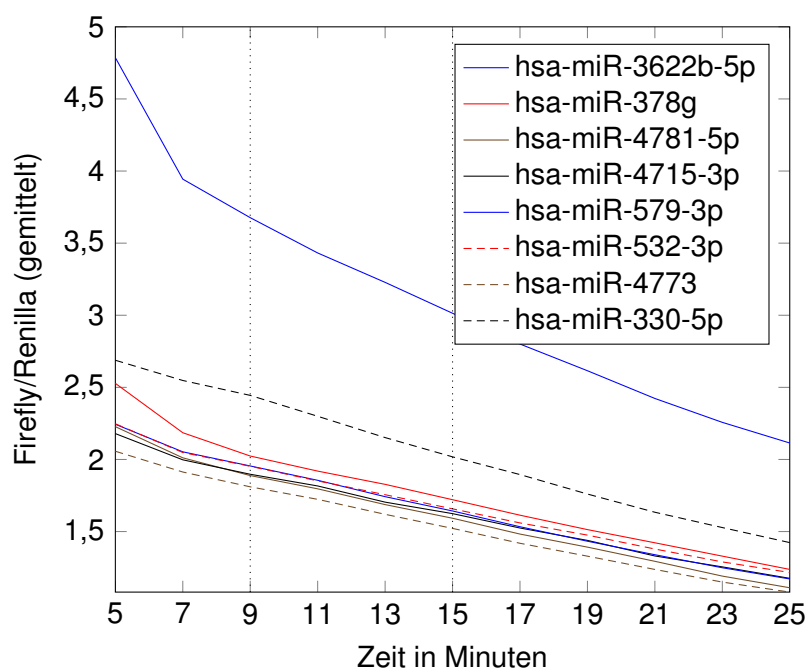


Abbildung 2.6: Zeitlicher Verlauf der Lumineszenzmessung, exemplarisch dargestellt anhand acht miRNAs. Die Ordinatenachse repräsentiert das Verhältnis der Firefly-Messung zur Renilla-Messung, nachdem die Mittelung der Triplikate vorgenommen wurde (vgl. Abb. 2.3). Die Abszisse beschreibt den Zeitpunkt der Messung nach Start der Enzymreaktion. Durch gepunktete Linien ist der Zeitraum zwischen Minute 9 und 15 hervorgehoben, welcher zur Durchschnittsbildung herangezogen wurde. Es zeigt sich eine lineare Abnahme der Aktivität.

2. Anschließend wurde eine einfache Normalisierung angewandt, indem für jedes Nöpfchen das Verhältnis von F_{9-15} zu R_{9-15} berechnet wurde.
3. Da stets drei Nöpfchen pro miRNA und HMI bzw. CMI angelegt wurden (vgl. Abbildung 2.3), wurde nun der Mittelwert der Triplets gebildet. Um die Hintergrundaktivität zu eliminieren, wurden jeweils die Werte der miRNAs durch die der H_2O -Kontroll-Triplets (diese enthalten nur Wasser und keine miRNAs, somit kann von einer maximalen Luciferase-Aktivität ausgegangen werden) geteilt.
4. In einem weiteren Schritt wurde nun das Verhältnis der Aktivität vom Reportervektor HMI zum Kontrollvektor CMI bestimmt, um somit eine prozentuale

Angabe der miRNA-Herabregulierung in Bezug auf die maximale Aktivität zu erhalten.

2.2.3 Genetische Analysen

2.2.3.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung der ausgewählten SNPs wurde in Zusammenarbeit mit Frau Inge-Regine Reck (Zentrum für Psychische Gesundheit, Universitätsklinikum Würzburg) durchgeführt.

Der KASP™ Genotyping Assay basiert auf einer speziellen Form der kompetitiven allel-spezifischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kombiniert mit einem fluoreszenz-basierten Reporter-System und ermöglicht die Bestimmung genetischer Variationen auf der Nukleotid-Ebene, wie z. B. SNPs. Der hierzu eingesetzte Assay (KASP; LGC Group Ltd., Teddington, United Kingdom) verwendet neben der aufbereiteten, zu untersuchenden DNA den KASP™ Assay Mix und den KASP™ Master Mix. Der Assay Mix enthält zwei allel-spezifische *forward primer*, sowie einen allgemeinen *reverse primer*. Die beiden *forward primer* besitzen an ihrem 5'-Ende einen eindeutigen Sequenzabschnitt, der mit speziellen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Molekülen korrespondiert, welche verschiedene Farbstoffe verwenden (FAM™ und HEX™). Im Master Mix sind neben der *Taq*-Polymerase, Nukleotiden und MgCl₂ die FRET-Moleküle enthalten. Diese befinden sich in einem *gequenchten* Zustand, d. h. die Fluoreszenzenergie des Reporter-Farbstoffes wird auf das benachbarte Quencher-Molekül übertragen, und so eine Emission unterdrückt.

Bei der Durchführung der PCR bindet der entsprechende allel-spezifische Primer an die DNA und elongiert (Abb. 2.7 auf Seite 42). Innerhalb der darauf folgenden Runden wird nun auch jeweils der Komplementärstrang amplifiziert, der mit den gequenchten FRET-Molekülen korrespondiert. Durch Anlagerung ebendieser an die DNA kommt es zur räumlichen Trennung von Quencher und dem FRET-Molekül, wodurch die Fluoreszenz nun quantifiziert werden kann. Durch die Konkurrenz der zwei allel-spezifischen *forward primer* kann somit eine Unterschei-

derung der Allele durchgeführt werden. Ist der Genotyp des zu bestimmenden SNP homozygot, wird nur das Signal eines der Reporter-Farbstoffe detektiert; im Falle von Heterozygotie wird ein gemischtes Fluoreszenz-Signal detektiert.

2.2.3.2 Assoziationsanalyse

Ein SNP ist eine Variation in der DNA, die zwischen verschiedenen Individuen einer Population auftritt und nur in der Abweichung einer einzelnen Base besteht. SNPs treten über das Genom verteilt unterschiedlich gehäuft auf, mit einer durchschnittlichen Frequenz von etwa 2 SNPs pro 1000 Basen. Der Großteil der SNPs hat keine Auswirkung auf die Genexpression und wird als „silent“ oder „synonym“ bezeichnet. Liegt ein Polymorphismus jedoch in einer Region, die z. B. für eine miRNA oder die Bindungsstelle einer miRNA kodiert, kann es hierdurch zu einem Aminosäurewechsel und zu Veränderungen des Transkriptoms, bis hin zur Entstehung von Krankheiten kommen [109].

Mittels einer Assoziationsanalyse kann geprüft werden, ob ein bestimmtes SNP häufiger in einer Population vorhanden ist, welche eine bestimmte Krankheit aufweist, als in einer gesunden Kontrollpopulation. Eine mögliche Korrelation beweist jedoch keinen kausalen Zusammenhang und muss durch weitere Analysen verifiziert werden.

Hierzu wurden die ausgewählten SNPs der Studienpopulationen genotypisiert und einer statistischen Analyse unterzogen, um zu überprüfen, ob diese mit dem Phänotyp Panikstörung mit Agoraphobie assoziiert sind.

Die SNP-Auswahl erfolgte mittels der Webapplikation „LD TAG SNP Selection“ des „National Institute of Environmental Health Sciences“. Ausgehend von den Koordinaten der präferierten miRNAs wurden diese DNA-Bereiche inklusive der flankierenden Regionen von 2000 Basen stromaufwärts bzw. 500 Basen stromabwärts untersucht. Die Suche wurde mit den dort empfohlenen Standardparametern

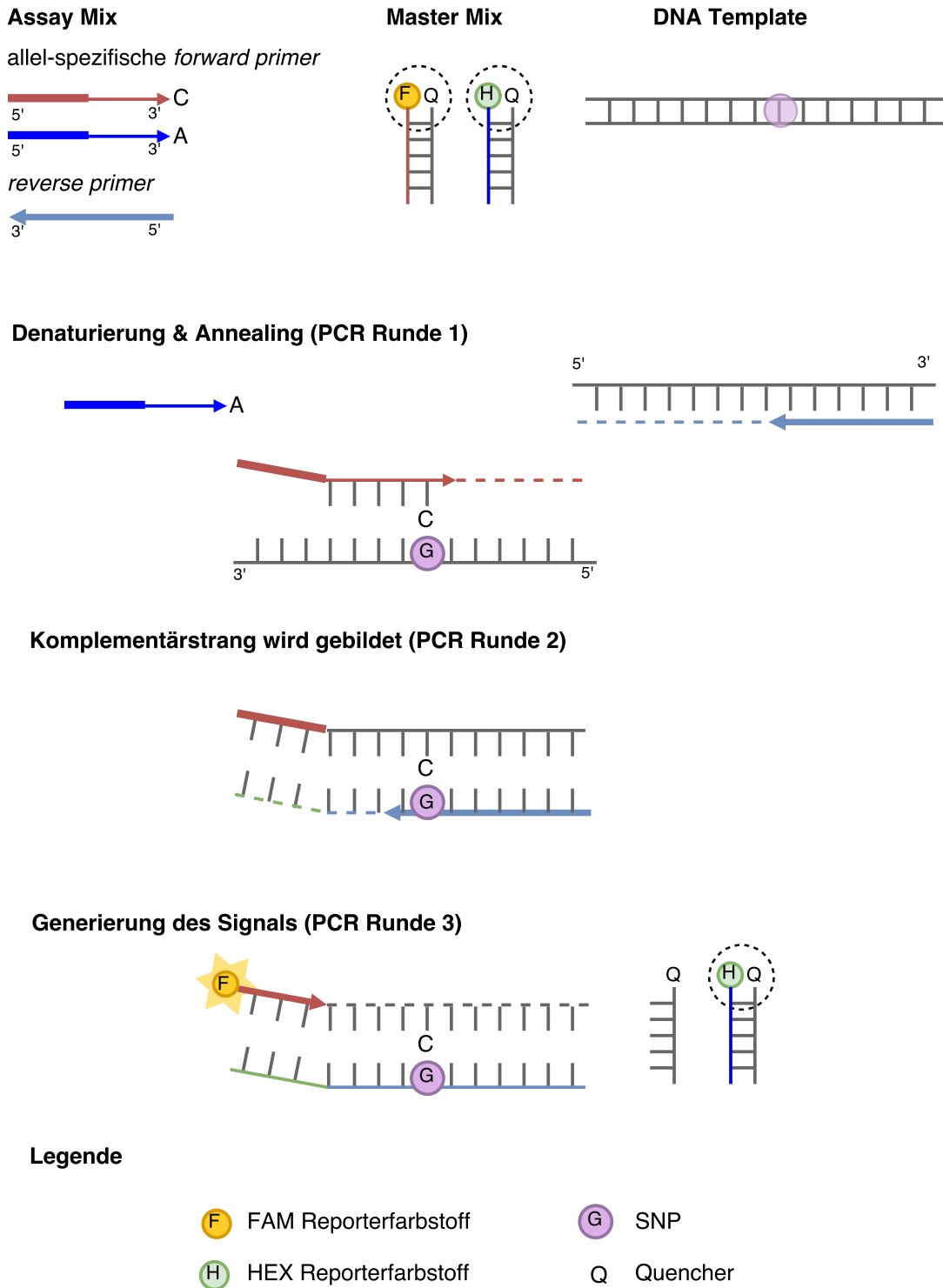


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des Prinzips der allelspezifischen kompetitiven KASP™-PCR. Nach der Denaturierung kommt es zur Anlagerung der allel-spezifischen Primer und zur Elongation. Bei der Bildung des Komplementärstrangs werden nun die *gequenchten* Reporterfarbstoffe benutzt. Es kommt zur räumlichen Trennung von Farbstoff und Quencher, wodurch ein messbares Signal detektiert werden kann (Eigene Darstellung, in Anlehnung an LGC Biosearch „How does KASP work“, <https://biosearchtech.com/support/education/kasp-genotyping-reagents/how-does-kasp-work>)

durchgeführt. Vorausgesetzt wurde eine Minor Allele Frequency (MAF) $> 0,05$. Dabei wurden die Datensätze der Population CEU des „International HapMap Projects“ sowie der europäischen Population von „dbSNP“ („Single Nucleotide Polymorphism database“) durchsucht. Folgende SNPs wurden auf diese Weise zur Genotypisierung ausgewählt: rs1333953 (MIR378G), rs1760512 (MIR378G), rs10874892 (MIR378G), rs11165236 (MIR378G), rs4847356 (MIR378G), rs7252448 (MIR330), rs2286755 (MIR330), rs12050652 (MIR4715), rs2910931 (MIR579), rs66683138 (MIR3622A), rs522881 (MIR3622B), rs554687 (MIR3622B), rs2582372 (MIR3622B), rs17384485 (MIR3622B), rs1046668 (MIR4773-2) und rs10432476 (MIR4773-1). Zudem wurde rs7194256 genotypisiert, eine Variante innerhalb der 3'-UTR von SLC6A2, welche mittels der „PolymiRTS Database“ ausgewählt wurde. Diese online durchsuchbare Datenbank erlaubt es Nutzern, natürlich auftretende Polymorphismen innerhalb von miRNA-Bindestellen auf ihre Auswirkungen bezüglich der errechneten Wirkung zu untersuchen.

Die Probanden wurden im Rahmen der übergeordneten CRC-TRR-58 MEGA Studie bzw. des BMBF „PanicNet“ RCT Projekts rekrutiert. Für eine detailliertere Beschreibung der untersuchten Samples wird auf die entsprechenden Veröffentlichungen verwiesen [110–113].

Kurz zusammengefasst besteht die Fallgruppe (cases) aus nicht-verwandten, deutschen Patienten mit „Panikstörung mit Agoraphobie“ ($n = 506$, durchschnittliches Alter $35,19 \pm 10,66$ Jahre, 70,4 % weiblich, Median(Alder) = 34 Jahre), welche im Rahmen des BMBF „PanicNet“-Projektes an verschiedenen Standorten in Deutschland rekrutiert wurden. Unabhängige Kontrollen ($n = 511$, durchschnittliches Alter $31,71 \pm 8,56$ Jahre, 69,7 % weiblich, Median(Alder) = 29 Jahre), welche von erfahrenen Psychologen auf die Abwesenheit von Achse-I-Störungen gescreent wurden (auf Basis eines strukturierten klinischen Interviews (Mini International Neuropsychiatric Interview) gemäß DSM-IV-Kriterien [114]) wurden aus dem Kollektiv der CRC-TRR-58 MEGA Studie selektiert, um ein 1:1-Matching in

Bezug auf Alter und Geschlecht zu erreichen.

Beide untersuchten Gruppen wurden mittels deutscher Versionen des ASI [2] und ACQ [4] eingestuft.

Die CRC-TRR-58 MEGA Studie wurde überprüft und genehmigt von der Ethikkommission der Universität Würzburg (EK 7/08). Das BMBF „PanicNet“ RCT Projekt wurde überprüft und genehmigt von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden (EK 164082006) und der Deutschen Gesellschaft für Psychologie (AH11.2009). Alle Studienteilnehmer erteilten schriftlich ihr Einverständnis, nachdem sie eine ausführliche Aufklärung über die Studienbedingungen erhalten hatten [115].

2.2.3.3 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Luciferase-Messungen sowie der Vergleiche der *in silico*-Prädiktion mit den gemessenen Ergebnissen wurden mittels „Mann-Whitney-U-Test“ bzw. „Spearman's Rangkorrelationskoeffizient“ überprüft.

Alle SNPs wurden auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium bezüglich der Verteilung ihrer Genotypen mittels χ^2 -Test abgeschätzt. Ein zweiseitiger *t*-Test für unabhängige Stichproben wurde durchgeführt, um die demographischen und phänotypischen Variablen zwischen Fall- und Kontrollgruppe zu vergleichen. Im Rahmen der Assoziationsstudie kamen folgende genetische Modelle zum Einsatz:

- additives Modell (mm / mM / MM)
- Allel-Frequenz-Modell (m / M)

Auch hierbei wurde mittels χ^2 -Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet. Im Fall eines statistisch selten ($n < 5$) beobachteten Ereignisses (Allel bzw. Genotyp) wurde stattdessen der exakte Fisher-Test genutzt – dies war der Fall bei $p_{\text{add}}(\text{rs2910932})$ und $p_{\text{add}}(\text{rs8039677})$.

Die Analysen bezüglich der Effekte auf ASI- und ACQ-Score wurden mittels linearer Regression bzw. multivariater Varianzanalysen durchgeführt. Zur Berücksichtigung von multiplen Tests wurde die Sidak-Korrektur verwendet.

Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Für die statistischen Analysen dieser Arbeit wurde die Software IBM® SPSS® Statistics (Version 24) sowie Microsoft® Excel® 2011 verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 *In silico*-Prädiktion potentieller microRNA-Regulatoren von *SLC6A2*

Wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, wurden drei im Internet verfügbare Datenbanken nach potentiellen miRNA-Regulatoren von *SLC6A2* durchsucht. Die für *SLC6A2* prädiktierten miRNAs und Scores sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Zu beachten ist, dass die Datenbanken unterschiedliche Algorithmen und Wertungssysteme verwenden; somit lassen sich die ermittelten Scores nur indirekt miteinander vergleichen.

Tabelle 3.1: Mittels TargetScan, DIANA microT-CDS und miRDB prädiktierten miRNA-Regulatoren von *SLC6A2*. Die jeweiligen Scores der drei Datenbanken sind voneinander unabhängig und lassen sich nicht direkt miteinander vergleichen.

miRNA	TargetScan 6.2	DIANA	miRDB 4
hsa-miR-129-5p			70
hsa-miR-1303		0,837	
hsa-miR-146a-3p		0,883	
hsa-miR-198	-0,411		
hsa-miR-3155b	-0,277		
hsa-miR-3200-5p	-0,313		71
hsa-miR-330-5p		0,756	
hsa-miR-361-5p		0,768	
hsa-miR-3616-3p	-0,340		
hsa-miR-3619-5p	-0,339		
hsa-miR-3622b-5p	-0,361		
hsa-miR-362-3p	-0,346		
hsa-miR-3661	-0,420	0,755	
hsa-miR-3665	-0,295		
hsa-miR-3689a-3p	-0,374		

3 Ergebnisse

Fortsetzung von Tabelle 3.1

miRNA	TS 6.2	DIANA	miRDB4
hsa-miR-378g	-0,348		
hsa-miR-3921		0,865	
hsa-miR-3925-5p			73
hsa-miR-3943	-0,275	0,860	
hsa-miR-4268	-0,410		
hsa-miR-4290	-0,430		
hsa-miR-4435	-0,319		
hsa-miR-4450	-0,306		
hsa-miR-4471	-0,398		
hsa-miR-4653-5p		0,880	
hsa-miR-4668-5p	-0,291		
hsa-miR-4706	-0,278		
hsa-miR-4713-3p	-0,315		
hsa-miR-4715-3p	-0,319		
hsa-miR-4728-5p	-0,401	0,909	74
hsa-miR-4733-5p		0,801	
hsa-miR-4749-5p	-0,306		
hsa-miR-4773		0,803	
hsa-miR-4778-5p	-0,278		72
hsa-miR-4781-5p	-0,331	0,785	
hsa-miR-4786-3p	-0,281		
hsa-miR-532-3p		0,828	
hsa-miR-548p		0,800	
hsa-miR-579-3p			
hsa-miR-600	-0,276		74
hsa-miR-631	-0,399		
hsa-miR-664b-3p			
hsa-miR-718	-0,542		
hsa-miR-761	-0,350		

Ende von Tabelle 3.1

3.2 Ergebnisse Genexpressionsanalysen

3.2.1 Ergebnisse Luciferase-Assay

Ausgehend von der Auswahl der *in silico* prädiktierten miRNAs wurde – wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben – ein Luciferase-Assay durchgeführt, um *in vitro* deren Wirkung auf die Expression von *SLC6A2* zu verifizieren. Die Ergebnisse des Luciferase-Assays sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Zehn der untersuchten miRNAs zeigten eine Abnahme der normalisierten Luciferase-Aktivität auf unter 85 % ohne Überlappung ihrer Konfidenzintervalle mit der Negativkontrolle *ath-mir-159a* (siehe Abbildung 3.1 auf S. 50). Dies wird als Hinweis auf ihre funktionelle Relevanz angesehen, weshalb sie als Basis der weiteren Analysen herangezogen wurden.

Tabelle 3.2: Übersicht des Screenings einer *SLC6A2*-Regulation durch miRNAs. 44 *in silico* prädiktierte miRNAs wurden experimentell mittels Luciferase-Assay überprüft. Die Aktivität spiegelt die Potenz der Inhibition im Luciferase-Assay nach o.g. Normalisierungen wider (% der maximalen Luciferase-Aktivität). Die hier aufgeführten Werte werden als Mittelwert und SEM (*standard error of the mean*) von mindestens $n = 3$ unabhängiger technischer Triplikate dargestellt.

miRNA	Aktivität	SEM	95%	-	CI
hsa-miR-129-5p	1,027	0,027	0,683	-	1,371
hsa-miR-1303	0,949	0,007	0,920	-	0,978
hsa-miR-146a-3p	0,997	0,092	0,703	-	1,290
hsa-miR-198	1,075	0,069	0,854	-	1,295
hsa-miR-3155b	1,039	0,063	0,863	-	1,215
hsa-miR-3200-5p	0,976	0,038	0,853	-	1,098
hsa-miR-330-5p *	0,585	0,039	0,488	-	0,681
hsa-miR-361-5p	1,016	0,085	0,650	-	1,383
hsa-miR-3616-3p	0,889	0,093	0,594	-	1,185
hsa-miR-3619-5p	1,029	0,106	0,691	-	1,368
hsa-miR-3622b-5p *	0,831	0,047	0,722	-	0,940
hsa-miR-362-3p	1,029	0,051	0,866	-	1,193
hsa-miR-3661	0,996	0,081	0,738	-	1,254
hsa-miR-3665	0,991	0,062	0,793	-	1,188
hsa-miR-3689a-3p	1,047	0,080	0,824	-	1,270
hsa-miR-378g *	0,572	0,015	0,539	-	0,606
hsa-miR-3921 *	0,830	0,035	0,720	-	0,940
hsa-miR-3925-5p	1,154	0,037	0,995	-	1,313

3 Ergebnisse

Fortsetzung von Tabelle 3.2

miRNA	Aktivität	SEM	95%	-	CI
hsa-miR-3943	0,833	0,066	0,624	-	1,042
hsa-miR-4268	0,917	0,087	0,639	-	1,195
hsa-miR-4290	0,983	0,099	0,668	-	1,298
hsa-miR-4450	0,976	0,049	0,821	-	1,131
hsa-miR-4471	0,949	0,043	0,811	-	1,088
hsa-miR-4450	0,976	0,049	0,821	-	1,131
hsa-miR-4471	0,949	0,043	0,811	-	1,088
hsa-miR-4653-5p	0,913	0,087	0,636	-	1,190
hsa-miR-4668-5p	0,815	0,063	0,614	-	1,016
hsa-miR-4706	0,942	0,045	0,797	-	1,087
hsa-miR-4713-3p	0,896	0,065	0,690	-	1,102
hsa-miR-4715-3p *	0,758	0,025	0,701	-	0,815
hsa-miR-4728-5p	0,973	0,093	0,677	-	1,270
hsa-miR-4733-5p	0,921	0,043	0,738	-	1,105
hsa-miR-4749-5p	0,858	0,062	0,662	-	1,054
hsa-miR-4773 *	0,832	0,057	0,697	-	0,966
hsa-miR-4778-5p	1,013	0,056	0,835	-	1,191
hsa-miR-4781-5p *	0,590	0,034	0,510	-	0,670
hsa-miR-4786-3p	0,989	0,090	0,702	-	1,276
hsa-miR-532-3p *	0,839	0,036	0,750	-	0,928
hsa-miR-548p	0,940	0,046	0,793	-	1,087
hsa-miR-579-3p *	0,812	0,037	0,726	-	0,899
hsa-miR-600	1,002	0,108	0,659	-	1,345
hsa-miR-631	0,852	0,067	0,638	-	1,067
hsa-miR-664b-3p *	0,724	0,039	0,599	-	0,848
hsa-miR-718	0,995	0,049	0,838	-	1,152
hsa-miR-761	1,032	0,037	0,913	-	1,151
ath-miR-159a	1,040	0,027	0,982	-	1,097

Ende von Tabelle 3.2

3.2.2 Vergleich Ergebnisse mit Prädiktionen

Setzt man die *in vitro* gemessenen Werte (Tab. 3.2) der Luciferase-Aktivität in Relation zu den ungefilterten *in silico* prädiktierten Werten, lässt sich bei DIANA microT-CDS (Abb. 3.3) eine signifikante Korrelation zwischen dem *in silico* prädiktierten Score und der *in vitro* gemessenen Aktivität im Luciferase-Assay feststellen.

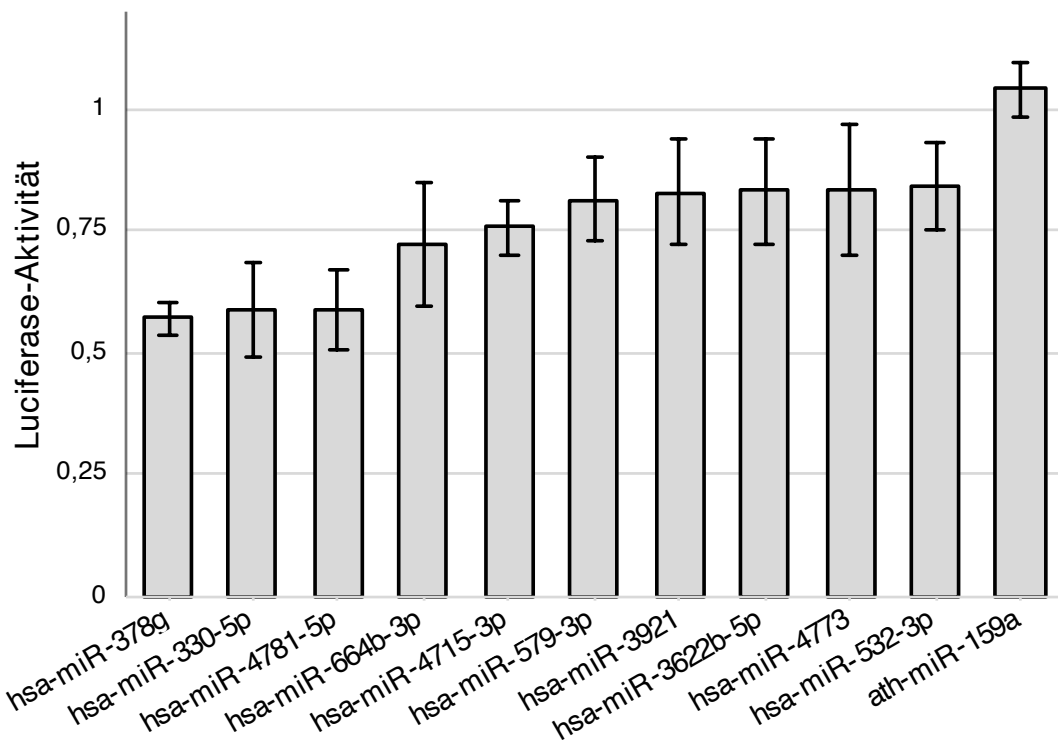


Abbildung 3.1: Boxplot der Ergebnisse des Luciferase-Assays. Dargestellt sind die Aktivitäten der maximalen Luciferase-Aktivität der zehn miRNAs (sowie der pflanzlichen Kontroll-miRNA *ath-mir-159a*) mitsamt der 95 %-Konfidenzintervalle, welche alle außerhalb des Konfidenzintervalls der pflanzlichen Kontrolle liegen und somit einen signifikanten Einfluss zeigen. (Abbildung in Anlehnung an [115], worin Teile dieser Arbeit veröffentlicht wurden)

Für TargetScan (Abb. 3.2) und miRDB (Abb. 3.4) lässt sich diesbezüglich keine signifikante Korrelation feststellen.

Hier gilt zu berücksichtigen, dass in dieser Analyse alle ungefilterten Scores, das heißt ohne Berücksichtigung eines Cut-off, im Sinne einer explorativen Auswertung einfließen.

Eine Übersicht der *in vitro* in Bezug auf die Luciferase-Aktivität effektivsten miRNA mit ihren entsprechenden *in silico* prädiktierten Werten ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

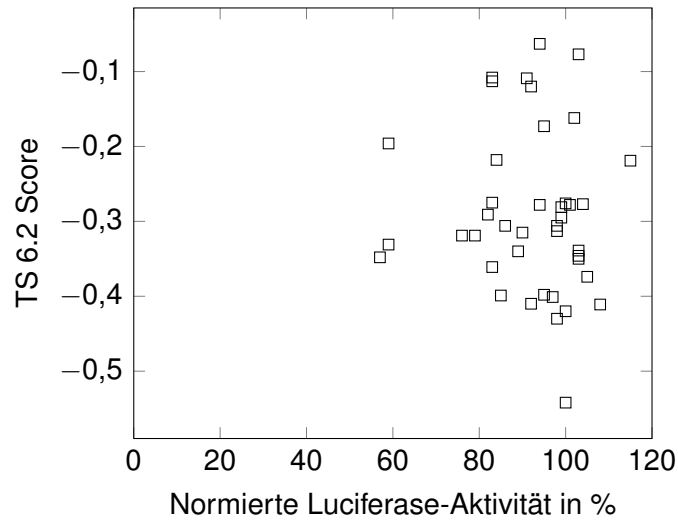


Abbildung 3.2: Streudiagramm der mittels TargetScan 6.2 prädiktierten miRNAs. Aufgetragen ist der jeweilige prädizierte Score (TS 6.2 Score) ohne Berücksichtigung eines Cut-off gegen die normierte Aktivität (%) der miRNA im Luciferase-Assay. Es lässt sich keine signifikante Korrelation feststellen: *Spearman's rho* = -0.127 ; $p = 0,428$ (zweiseitiger Test), $n = 41$.

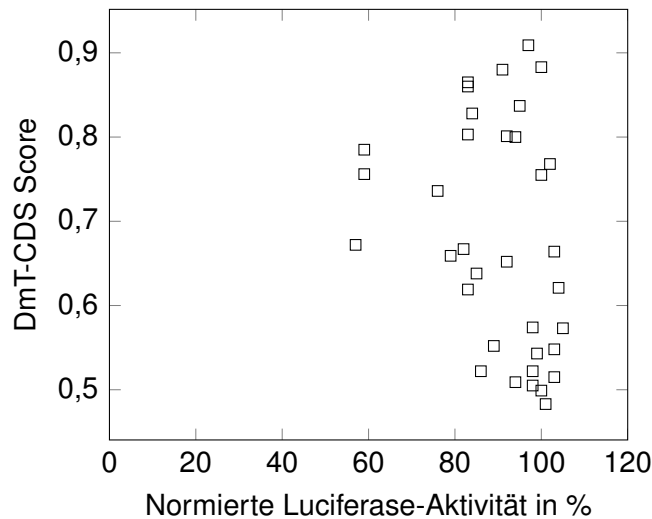


Abbildung 3.3: Streudiagramm der mittels DIANA microT-CDS prädiktierten miRNAs. Aufgetragen ist der jeweilige prädizierte Score (DmT-CDS) ohne Berücksichtigung eines Cut-off gegen die normierte Aktivität (%) der miRNA im Luciferase-Assay. Es lässt sich eine signifikante Korrelation feststellen: *Spearman's rho* = -0.371 ; $p = 0,028$ (zweiseitiger Test), $n = 35$.

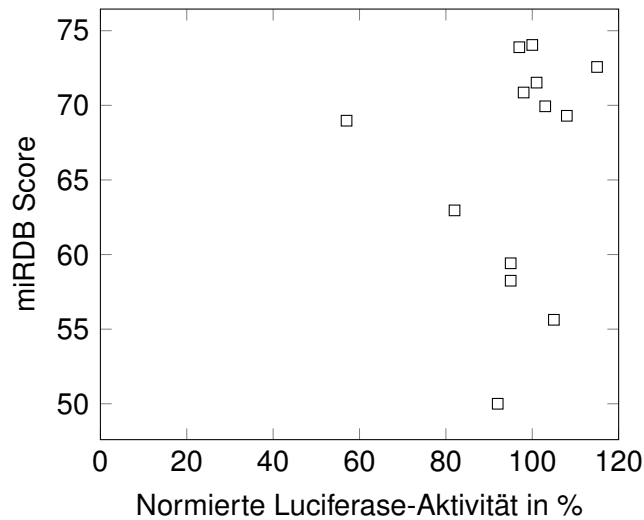


Abbildung 3.4: Streudiagramm der mittels miRDB prädiktierten miRNAs. Aufgetragen ist der jeweilige von miRDB prädizierte Score (miRDB Score) ohne Berücksichtigung eines Cut-off gegen die normierte Aktivität (%) der miRNA im Luciferase-Assay (n = 13). Es lässt sich keine signifikante Korrelation feststellen: *Spearman's rho* = 0,393; $p = 0,184$ (zweiseitiger Test).

Tabelle 3.3: Prädizierte Werte von den Suchmaschinen DIANA microT-CDS, TargetScan 6.2 und miRDB, sowie die jeweilige *in vitro* gemessene Inhibition (Luciferase-Aktivität)

miRNA	DmT-CDS	TS6.2	miRDB	Aktivität
hsa-miR-378g	0,672	-0,348		57,2 %
hsa-miR-330-5p	0,756	-0,196		58,5 %
hsa-miR-4781-5p	0,785	-0,331		59,6 %
hsa-miR-664b-3p	0,860		81	72,4 %
hsa-miR-4715-3p	0,736	-0,319		75,8 %
hsa-miR-579-3p	0,888	-0,149		81,2 %
hsa-miR-3921	0,865			83,0 %
hsa-miR-3622b-5p	0,619	-0,361		83,1 %
hsa-miR-4773	0,803	-0,113		83,2 %
hsa-miR-532-3p	0,828	-0,218		83,9 %

3.3 Genetische Analysen

Wie auf Seite 41 beschrieben, wurden TagSNPs zur Genotypisierung bestimmt. Für MIR532, MIR664B, MIR3921 sowie MIR4781 konnten keine entsprechenden SNPs identifiziert werden. Die Genotypisierungs-Daten rs12151009 (MIR330) hielten nicht der Qualitätskontrolle stand und wurden in den weiteren Berechnungen nicht berücksichtigt, sodass letztlich 17 SNPs in die weiteren Berechnungen einfließen.

Um eine mögliche Assoziation dieser Polymorphismen mit Angsterkrankungen offenzulegen, wurden die Polymorphismen in einer PD/AG-Population sowie einer gesunden Kontrollpopulation genotypisiert und auf eine mögliche Assoziation hin untersucht.

Die Genotypenfrequenzen aller untersuchten SNPs ähneln denen einer europäischen Referenzpopulation („1000 Genomes Project Phase 3“, Ensembl release 87 - Dezember 2016, European Population zusammengesetzt aus den Populationen CEU, FIN, GBR, IBS und TSI), daher sind populationsspezifische Eigenschaften, welche die Aussagekraft der Analyse einschränken könnten, als eher unwahrscheinlich zu betrachten (Tabelle 3.4). Es konnte bestätigt werden, dass keiner der untersuchten SNPs in der Fall- und Kontrollgruppe eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium aufweist. Alle Varianten erfüllen somit die formalen Voraussetzungen für den Einschluss in die weiteren Analysen.

3.3.1 Assoziationsanalyse SNP x PD/AG

Es zeigt sich, dass die Ausprägung mehrerer Marker assoziiert ist mit dem Vorhandensein der Eigenschaft PD/AG (Tabelle 3.5 auf Seite 54): eine nominelle Assoziation mit PD/AG ließ sich für das (minor) T-Allel von rs2910931 ($p_{\text{allel}} = 0,004$), sowie das (major) A-Allel von rs2582372 ($p_{\text{allel}} = 0,023$) feststellen. Auch nach Korrektur für multiples Testen lässt sich bei rs2910931 weiterhin ein statistischer

3 Ergebnisse

Tabelle 3.4: Allelfrequenzen der untersuchten SNPs im Vergleich: für jeden der genotypisierten Polymorphismen sind die MAF des Patientenkollektivs (Cases), des Kontrollkollektivs (Controls) sowie entsprechender Referenzpopulationen des „1000 Genomes Project Phase 3“ (EUR, TSI, CEU) angegeben.

SNP	Allel	Cases	Controls	TSI	CEU	EUR
rs1333953	G	0,36	0,36	0,35	0,42	0,37
rs1760512	G	0,39	0,40	0,37	0,37	0,39
rs2910931	T	0,43	0,37	0,52	0,44	0,40
rs66683138	A	0,25	0,23	0,25	0,20	0,21
rs12050652	C	0,42	0,46	0,36	0,47	0,46
rs1046668	G	0,17	0,16	0,14	0,15	0,14
rs10874892	C	0,25	0,23	0,27	0,21	0,23
rs11165236	A	0,22	0,24	0,18	0,22	0,21
rs4847356	C	0,23	0,23	0,29	0,28	0,27
rs522881	A	0,44	0,42	0,34	0,46	0,42
rs554687	C	0,43	0,44	0,52	0,38	0,46
rs2582372	T	0,15	0,18	0,21	0,15	0,21
rs17384485	T	0,36	0,35	0,36	0,32	0,31
rs15534	T	0,14	0,15	0,13	0,15	0,15
rs10432476	T	0,45	0,45	0,58	0,46	0,49
rs7252448	T	0,25	0,25	0,25	0,24	0,27
rs2286755	G	0,16	0,16	0,19	0,16	0,19
rs7194256	T	0,14	0,15	0,13	0,15	0,15

Trend ($p_c = 0,069$) erkennen.

Für alle weiteren SNPs einschließlich des 3'-UTR-SNP ließ sich mittels der ermittelten Daten kein Anhalt für eine signifikante Assoziation feststellen.

Tabelle 3.5: Assoziationsanalyse: detaillierte Darstellung der beiden signifikanten Marker rs2910931 und rs2582372 mit Panikstörung mit Agoraphobie in Patienten und Kontrollen sowie das Ergebnis des χ^2 -Tests und dem sich daraus ergebenden p-Wert.

SNP	Allele	Cases	Controls	χ^2	p-Wert
rs2910931	TT/AT/AA	94/241/163	71/229/204	8,057	0,018
	T/A	429/567	371/637	8,203	0,004
rs2582372	TT/AT/AA	15/115/368	15/155/335	7,427	0,024
	T/A	145/851	185/825	5,154	0,023

3.3.2 Assoziationsanalyse ASI/ACQ - lineare Regression

Des Weiteren wurden die SNPs auf eine Assoziation hinsichtlich der Merkmalsausprägung Angst im Sinne der ASI- und ACQ-Summscores untersucht. Dazu wurden die ASI- und ACQ-Summscores der Studienteilnehmer verwendet und mittels linearer Regression unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht sowie unter der Annahme eines kumulativen Risiko des Minorallels untersucht (Tabelle 3.6). Hierbei ließ sich für rs2910931 eine signifikante Assoziation zwischen der Anzahl der (minor) T-Allele und dem ASI-Wert ($\beta = 0,371$, $p = 0,029$, 95 %-CI 0,039-0,702) sowie dem ACQ-Wert ($\beta = 0,012$, $p = 0,041$, 95 %-CI 0,000-0,023) erkennen. Dies steht somit in Einklang mit den oben genannten Ergebnissen des additiven genetischen Modells im Rahmen der Fall-Kontroll-Assoziationsanalyse. Für alle weiteren untersuchten SNPs ließen sich anhand der Daten keine signifikanten Beobachtungen ableiten.

Tabelle 3.6: Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Genotypen der untersuchten SNPs und den entsprechenden ASI- bzw. ACQ-Summscores angepasst nach Geschlecht und Alter. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind fett hervorgehoben.

SNP	ASI		ACQ	
	β	p	β	p
rs1333953	-0,051	0,262	-0,082	0,109
rs1760512	-0,009	0,784	0,004	0,897
rs10874892	0,000	0,995	-0,028	0,590
rs11165236	0,021	0,645	0,072	0,155
rs4847356	-0,022	0,637	0,037	0,467
rs2286755	-0,040	0,387	0,015	0,775
rs7252448	-0,051	0,267	-0,012	0,819
rs12050652	0,001	0,979	-0,049	0,333
rs2910931	0,371	0,029	0,012	0,041
rs66683138	-0,012	0,794	-0,005	0,922
rs522881	0,024	0,590	0,016	0,747
rs554687	-0,025	0,586	-0,037	0,470
rs2582372	-0,013	0,783	0,017	0,734
rs17384485	-0,050	0,274	-0,070	0,168
rs10432476	-0,050	0,271	-0,070	0,168
rs1046668	-0,034	0,458	-0,059	0,243
rs7194256	-0,007	0,819	-0,006	0,856

4 Diskussion

4.1 *In silico*-Prädiktion potentieller microRNA-Regulatoren von *SLC6A2*

Aufgrund der vielen miRNAs und der großen Anzahl potentieller Bindungsstellen bedarf es computergestützter Hilfsmittel, um Interaktionen und deren Stärke abzuschätzen. Mittlerweile existieren eine ganze Reihe an Programmen mit verschiedenen Ansätzen und Qualitäten, die sich dieser Aufgabe widmen.

In dieser Arbeit wurden die Datenbanken TargetScan 6.2, DIANA microT-CDS sowie miRDB 4 ausgewählt, um Vorhersagen über potentielle miRNA-Regulatoren von *SLC6A2* zu treffen. Sie finden häufig Verwendung und zeichnen sich durch Benutzerfreundlichkeit, Zuverlässigkeit, Aktualität sowie einen ausreichenden Funktionsumfang aus [97]. Dennoch ist festzustellen, dass sich ihre Vorhersagen in vielen Fällen nur rudimentär überlappen. Auch in dieser Arbeit finden sich interessanterweise innerhalb der festgelegten Cut-off-Werte nur geringe Schnittmengen zwischen den einzelnen Datenbanken. Einzig hsa-miR-4728-5p wird von allen drei verwendeten Datenbanken detektiert. Sechs weitere miRNAs (hsa-miR-4781-5p, hsa-miR-3200-5p, hsa-miR-4778-5p, hsa-miR-600, hsa-miR-3943, hsa-miR-579, hsa-miR-644b-3p) wurden jeweils von zwei der drei Datenbanken prädiziert (Tabelle 3.1 auf Seite 46). Eine Aufhebung des Cut-off würde zwar eindeutig zu mehr Übereinstimmungen führen, ginge jedoch auch mit wesentlich mehr falsch-positiven Ergebnissen einher.

Kritisch bedacht werden sollten auch die Unterschiede der verschiedenen ver-

wendeten miRBase-Versionen zur miRNA-Annotationen zwischen den einzelnen Datenbanken. Während TargetScan 6.2 auf der miRBase-Version 17 basiert, wird von miRDB.org 4 und DIANA-microT-DS Version 18 verwendet (die kürzlich aktualisierten Versionen TargetScan 7.0 und miRDB.org 6 verwenden nun die aktuelle miRBase-Version 22). Aufgrund der raschen Entwicklung auf dem Forschungsgebiet der miRNA und der damit einhergehenden stets wachsenden Anzahl an bekannten miRNAs werden somit über 500 mittlerweile neu entdeckte, potentielle miRNAs von den verwendeten Prädiktionsalgorithmen nicht erfasst. Diese Heterogenität in der Prädiktion lässt sich nicht nur zwischen den einzelnen Datenbanken selbst, sondern auch innerhalb neuerer Versionen der Datenbank feststellen. Einige Monate nach Durchführung der Prädiktion und experimentellen Validierung mittels Luciferase-Assay wurden aktualisierte Versionen zweier Datenbanken veröffentlicht: miRDB 5.0 [108], sowie TargetScan 7.0 [116]. Neben verbesserten Algorithmen wurde in beiden Fällen die aktualisierte miRBase Nomenklatur implementiert.

Eine Gegenüberstellung der beiden Prädiktionen ergibt folgendes Bild: bei Vergleich derjenigen miRNA, welche einen von TargetScan 6.2 prädiktierten „context+ Score“ $< -0,275$ haben, mit denen von TargetScan 7.0 findet sich – nach Berücksichtigung von eventuellen Namensanpassungen bedingt durch Verwendung unterschiedlicher miRBase-Versionen – eine Übereinstimmung von 32,5%. Auch von den in der Arbeit getesteten miRNAs, welche von miRDB 4.0 prädiktiert wurden, finden sich nur noch zwei von elf (18,2%) in der Prädiktionsliste von miRDB 6.0 bei einem Cut-off-Wert von 70. Inwieweit sich die überarbeiteten Prädiktionsalgorithmen in einer verringerten Rate an falsch-positiven Ergebnissen widerspiegelt, muss überprüft werden.

Neuerungen in TargetScan 7.0: das von TargetScan 6.2 verwendete Modell zur Prädiktion und Bestimmung der Effizienz von miRNA target sites wurde überarbeitet und durch neue Ansätze ergänzt. Der von TargetScan 6.2 verwendete

„context+ score“, welcher Parameter wie die Art der seed site, 3'-supplementary paring, AU-reiche Regionen, den Abstand vom nächstgelegenen 3'-UTR-Ende sowie diverse miRNA-Eigenschaften berücksichtigt [100, 116], wurde durch den sogenannten „gewichteten context++ score“ ersetzt. In ihrem neuen Modell zogen Agarwald und Kollegen 26 mögliche Größen in Erwägung, von denen schließlich 14 selektiert wurden. Unter anderem werden nun auch die Art des Nukleotids an Position 1 und 8 der miRNA bzw. Position 8 der seed region berücksichtigt. Außerdem fließen sowohl der minimale Abstand der seed region vom Stoppcodon bzw. des Poly(A)-Schwanzes, als auch die Länge des offenen Leserahmens und der betreffenden 3'-UTR in die Berechnungen mit ein [116]. Dies führt dazu, dass TS 7.0 nach Angaben der Autoren signifikant besser als bisherige computergestützte Prädiktions-Modelle arbeitet [116].

Vergleicht man retrospektiv die ermittelten Aktivitäts-Werte der miRNAs (vgl. Abschnitt 3.2 auf Seite 48) mit den aktuellen TS 7.0 context++ Scores, lässt sich auch hier keine signifikante Korrelation der Prädiktion mit den gemessenen Werten erkennen (dies soll nur einer exploratorischen Abschätzung dienen – zu berücksichtigen ist, dass diese Werte auf einer einmaligen Erhebung basieren) (Abb. 4.1). Auch bei erneuter Korrelation der Screening-Ergebnisse ausschließlich unter Berücksichtigung von miRNAs mit einem TS 7.0 context++ Score $< -0,3$, um eine verminderte Rate an falsch-positiven Resultaten zu erhalten, lässt sich keine signifikante Korrelation feststellen (*Spearman's rho* = $-0,305$; $p = 0,310$; zweiseitiger Test)).

Zwar existieren Datenbanken, die einzig auf experimentell-validierten miRNA-mRNA-Interaktionen publizierter Daten basieren, wie z. B. DIANA-TarBase [117] und miRecords [118], diese sind jedoch aktuell noch äußerst limitiert in ihrem Umfang – was angesichts der großen Menge an potentiellen Interaktionen [96] nicht verwunderlich ist – und können daher nur spärliche Resultate liefern.

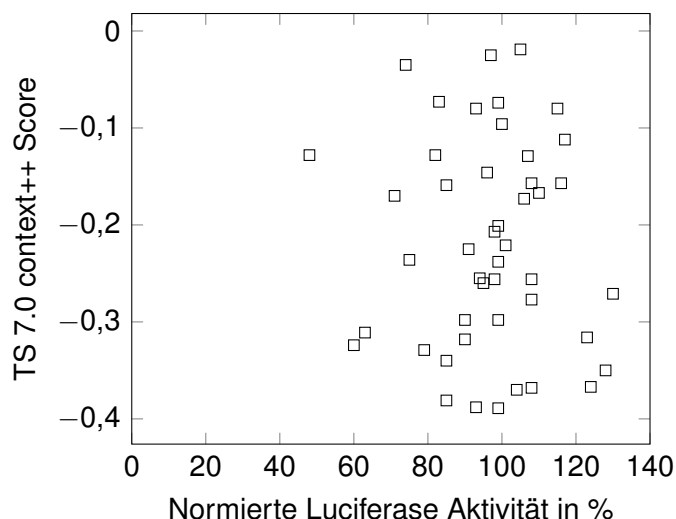


Abbildung 4.1: Streudiagramm der initial mittels Luciferase-Assay gescreenten miRNAs. Aufgetragen ist der jeweilige von TargetScan 7.0 prädizierte Score (context++ Score) gegen die normierte Aktivität (%) der miRNA im einmalig durchgeführten Luciferase-Assay-Screening. Es lässt sich (retrospektiv) keine signifikante Korrelation feststellen: *Spearman's rho* = -0,029; *p* = 0,848; zweiseitiger Test).

4.2 Genexpressionsanalysen

4.2.1 Diskussion Methodik Luciferase-Assay

Mittels Luciferase-Assay wurden die computergestützten Prädiktionen zunächst auf ihre Regulationswirkung hin überprüft. Es muss beachtet werden, dass es aktuell noch keine klare Übereinkunft darüber gibt, welche experimentellen Methoden durchgeführt werden sollten, um zu beweisen, dass tatsächlich eine relevante Interaktion zwischen miRNA und mRNA stattfindet. Unklar ist, ab welcher Stärke der Inhibierung im Luciferase-Assay von einer biologischen Wirksamkeit ausgegangen werden kann. Da miRNAs für das *fine-tuning* der Expression ihrer Zielgene verantwortlich sind [119], könnten auch subtile Änderungen der Genexpression bereits funktionell relevant sein.

Auch eine deutlich gemessene Inhibierung, welche mittels Luciferase-Assay detektiert wurde, muss nicht zwangsläufig einer relevanten Funktion im Organismus Mensch entsprechen. miRNAs unterliegen einer komplexen Regulation auf vielen Ebenen, die in großen Teilen noch unverstanden ist [120]. Zwar lassen sich

mit der hier verwendeten Methode direkte, kurzfristige Effekte der miRNA-mRNA-Interaktion beobachten; langfristige und womöglich entscheidende Konsequenzen, die sich dadurch für einen Organismus ergeben, lassen sich hieraus jedoch nicht unmittelbar ableiten.

Ein Problem des hier verwendeten Versuchsaufbaus, bei dem die 3'-UTR des Zielgens *SLC6A2* in den Reportervektor kloniert wurde, besteht darin, dass – wenn auch minderheitlich – miRNAs existieren, welche nicht innerhalb der 3'-UTR binden, sondern beispielsweise in der 5'-UTR oder innerhalb der codierende Sequenz (CDS) [121, 122], und hierdurch mittels dem hier verwendeten Luciferase-Assay nicht berücksichtigt werden. Aus evolutionärer Sicht betrachtet unterliegen die CDS und 3'-UTRs einer mRNA einem unterschiedlichen Selektionsdruck. In einer 3'-UTR können miRNA-Bindungsstellen ohne erhebliche Konsequenzen für das endgültige Protein entstehen bzw. wieder verschwinden, falls sich daraus kein Selektionsvorteil ergibt. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass Prädiktionsalgorithmen eine hohe Zahl an potentiellen Interaktionen voraussagen, sich diese jedoch in vielen Fällen als falsch-positiv bzw. funktionell irrelevant herausstellen. Bezüglich miRNA-Bindungsstellen in Bereich der CDS können Punktmutationen, die eine neue Bindung ermöglichen, dazu führen, dass die Proteinfunktion zu Einbußen in Sachen Funktionalität führt, was ein Grund für die geringere Prävalenz solcher CDS-Bindungsstellen sein mag [123]. Weitere Versuche könnten zum Ziel haben, diese zusätzlichen Zielbereiche wie 5'-UTR und CDS zu überprüfen, indem man sie zusätzlich stromabwärts des *Firefly Luciferase*-Gens kloniert.

Um die direkten Effekte einer miRNA zu messen und den Fall auszuschließen, dass die im Luciferase-Versuch ermittelte Inhibition durch andere Faktoren als die miRNA vermittelt wird, wurden Kontrollvektoren und eine pflanzliche Kontroll-miRNA sowie entsprechende Normalisierungen durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit den Einfluss der Seed-Region zu verifizieren bestünde darin, eine

künstliche Mutation einiger Basen in der Seed-Sequenz der ermittelten miRNA herbeizuführen. Dies sollte theoretisch zu einer Wiederherstellung der maximalen Luciferase-Aktivität führen, da nun keine ausreichende Erkennung bzw. Bindung der miRNA an die entsprechende mRNA erfolgen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Transfektion und den anschließenden Luciferase-Versuchen humane embryonale Nierenzellen (HEK293AD) verwendet. Diese Zelllinie findet gerne Verwendung, da sie sich durch ihre Robustheit und ihre vielfältigen Möglichkeiten hinsichtlich der Transfektion auszeichnet. Alternativ wäre die Verwendung eines anderen z. B. nicht-humanen Zellsystems möglich gewesen. Eine Option stellt der Einsatz einer Insektenzellkultur dar, welche bei einfacher Handhabung und geringer Kontaminationsgefahr hohe Erträge des jeweiligen Proteins ermöglicht, allerdings nicht zu humanen Glykosilierungsmustern der Proteine führt und somit Auswirkungen auf die biologische Aktivität haben kann [124].

Es wird davon ausgegangen, dass sich die zugrundeliegenden Prozesse bei Angsterkrankungen im zentralen Nervensystem abspielen (im Gegensatz zu den hier experimentell verwendeten embryonalen Nierenzellen). Eine Expression von NET findet sich in noradrenergen Neuronen, dem sympathischen Nervensystem, sowie der Lunge und der Plazenta [125]. Aus der grundsätzlichen Schwierigkeit heraus, entsprechende menschliche Untersuchungsproben aus dem zentralen Nervensystem zu gewinnen, müssen neue Konzepte oder valide Alternativen bestimmt werden.

Zudem sollte beachtet werden, dass die Regulation von Genen ein äußerst kontext-abhängiger Vorgang ist; es ist davon auszugehen, dass die tatsächliche Effektivität der Regulierung *in vivo* von zahlreichen weiteren Faktoren abhängig ist, welche sich nicht in einem solchen vereinfachten Modell berücksichtigen lassen [126]. Dies zeigt sich beispielsweise in gewebespezifischen Unterschieden bei der

miRNA-Biogenese [127].

In einer weiteren Studie konnten Unterschiede der maximalen Luciferase-Aktivität von mir-27a in Bezug auf die Regulierung eines validierten Zielgens zwischen HEK293-Zellen und zwei weiteren Zelllinien festgestellt werden [128]. Dem widersprechen wiederum Beobachtungen, in denen die miRNA-vermittelte Repression keine wesentlichen Unterschiede zwischen drei verschiedenen Zelllinien zeigte [129] (HEK293-, Huh7- und HeLa-Zellen wurden in dieser Studie verwendet, da sie einerseits große Unterschiede im Expressionsmuster ihrer endogenen miRNAs zeigen und sich zum anderen durch gute Transfektions-Eigenschaften auszeichnen). Inwiefern nun die durch die Luciferase-Assays ermittelten miRNAs tatsächlich im Menschen eine regulative Funktion auf *SLC6A2* ausüben, kann somit nicht zweifelsfrei ermittelt werden und muss durch weitere Versuche möglichst unter Berücksichtigung des physiologischen Kontextes überprüft werden.

4.2.2 Diskussion Ergebnisse Prädiktion und Luciferase-Assay

Wie im Methodenteil beschrieben, wurde im Screening jede der miRNA zwar in Triplets, jedoch nur einmalig mittels Luciferase-Assay auf ihre Fähigkeit hin überprüft, die Expression von *SLC6A2* zu inhibieren. Pro 96-well Platte wurden vier bzw. acht verschiedene miRNAs überprüft (Abb. 2.3 auf Seite 34), wobei je einmal pro 96-well Platte die pflanzliche Kontrolle ath-mir-159a eingesetzt wurde. Es wird angenommen, dass sich ihre Sequenz maximal von allen bekannten humanen miRNAs unterscheidet. Ihr Einfluss auf die 3'-UTR von *SLC6A2* sollte theoretisch gegen Null gehen und sich somit auf jeder der Platten in einem möglichst gleichen Luciferase-Aktivitäts-Wert widerspiegeln. Tatsächlich liegt der ermittelte normierte Durchschnittswert von ath-mir-159a bei 104,0 % (SEM = 0,027; CI = 98,2-109,7 %).

Interessanterweise lässt sich eine große Bandbreite der maximalen Luciferase-Aktivität zwischen den verschiedenen gescreenten miRNAs feststellen, die von

57 % bis 115 % reicht (Tab. 3.2 auf S. 48). Kritisch hinterfragt werden sollten Werte deutlich über 100 %. Dies lässt keine Repression, sondern eine gesteigerte mRNA-Expression vermuten. Möglicherweise handelt es sich hierbei um den Sonderfall einer positiven Genregulation durch miRNAs, was jedoch in Anbetracht der hier beobachteten Häufigkeit sowie der explorativen Natur des Screenings nicht unter signifikanten Gesichtspunkten festgestellt werden kann. Weitere Wiederholungsversuche wären nötig, um zunächst die Ergebnisse in dieser Höhe zu reproduzieren und gegebenenfalls in weiteren Zelllinien zu bestätigen. Möglicherweise spielen aber zellinterne Regulationsmechanismen bei dieser Beobachtung eine Rolle. Zudem muss berücksichtigt werden, dass miRNAs wahrscheinlich auch an eine Vielzahl von unbekanntem, nicht prädiktierten Stellen binden und Wirkungen ausüben.

Teilweise fallen vergleichsweise breite Standardabweichungen in Bezug auf die Luciferase-Aktivitäten auf (Tab. 3.2 auf S. 48). Möglicherweise entstehen Divergenzen diesbezüglich durch Pipettierfehler oder Inkonsistenzen beim Aussähen der Zellen auf die Mikrotiterplatten bzw. bei der Transfektion. Auch durch die leicht zeitversetzte Hinzugabe der Luciferase-Reagenzien können Unterschiede entstehen, welche jedoch durch eine Mittelung über einen sechsminütigen Zeitraum hinweg auszugleichen versucht wurden (vgl. Abb. 2.6 auf S. 38). Ebenso ist von einer grundsätzlichen Messungengenauigkeit des Biolumineszenz-Messgerätes auszugehen. Zwar wurde versucht, durch die Wahl des Pipettierschemas (vgl. Abb. 2.3 auf S. 34) den sog. *edge effect* zu vermeiden, um homogenere Resultate zu erzielen, dennoch kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle Näpfcchen mit exakt der gleichen Effizienz gemessen wurden.

Bei Betrachtung der prädiktierten Inhibition in Anbetracht der tatsächlich gemessenen Wirkung (vgl. Tabelle 3.1, 3.2 und 3.3) lässt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen besonders starker Prädiktion der Inhibition und tatsäch-

lich gemessener Inhibition erkennen.

Es muss sich die Frage gestellt werden, ob alleine ein signifikanter negativer Einfluss auf die Expression eines Genes, wie in solchen Luciferase-Assay-Versuchen feststellbar ist, zu einer biologisch funktionellen Inhibierung führt. Da hinsichtlich dessen keine etablierten Grenzwerte vorliegen, muss eine arbiträre Grenze gezogen werden. Andererseits muss darauf hingewiesen werden, dass miRNAs nicht als reine An- und Abschalter auf mRNA-Ebene gelten, sondern vielmehr als Modulatoren, welche komplexe Genexpressionsmuster ermöglichen, indem sie verschiedene Bindungsstellen an einer Vielzahl von mRNAs haben [99].

In Bezug auf die gewonnenen Daten ist auffällig, dass von den experimentell erfolgreichen miRNAs nur hsa-miR-4781-5p sowohl von DIANA microT-CDS als auch TargetScan 6.2 innerhalb der für das Screening festgelegten Cut-off-Grenzen enthalten ist (Tabelle 3.3 auf S. 52). Eine noch konservativere Wahl der Cut-off-Werte würde somit aktuell nicht zu einer optimierten Auswahl an miRNAs führen. Vielmehr scheint es nötig, die zugrunde liegenden Prinzipien der Suchmaschinen weiter zu erforschen, um die Prädiktionen weiter optimieren zu können. Durch die Kombination mehrerer renommierter Datenbanken kann die Rate an falsch-negativen Prädiktionen gesenkt werden, wenn falsch-positive Ergebnisse in Kauf genommen werden können.

Retrospektiv lässt sich bei Korrelation der *in vitro* gemessenen Aktivitäten mit ungefilterten – sprich unter Nicht-Berücksichtigung eines Cut-off – prädiktierten Scores eine signifikante Korrelation bezüglich der DIANA microT-CDS-Scores erkennen (siehe Abbildung 3.3 auf S. 51). Inwieweit dies jedoch für eine Überlegenheit der Datenbank spricht lässt sich hierdurch nicht sicher ableiten.

Trotz aller Schwächen dieses bioinformatischen Ansatzes stellt dieser dennoch die einzige kostengünstige Möglichkeit dar, potentielle miRNA-mRNA-Interaktionen

zu entdecken. Ungeachtet dessen ist eine experimentelle Bestätigung der Resultate noch unumgänglich.

4.3 Genetische Analysen

4.3.1 Diskussion Methodik Assoziationsstudie

Genetische Assoziations-Fall-Kontroll-Studien vergleichen die Genotyp- bzw. Allelfrequenzen an bestimmten Loci wie z. B. SNPs zwischen Individuen einer Population mit (cases) und ohne (controls) einem bestimmten Krankheitsmerkmal, um festzustellen, ob eine statistisch nachweisbare Assoziation zwischen ebendiesem und dem genetischen Marker besteht [130]. Insbesondere für psychische Krankheiten wie Angsterkrankungen, die mitunter auf einer komplexen genetischen Grundlage basieren, eignen sich Fall-Kontroll-Assoziationsstudien, um Suszeptibilitätsgene aufzuspüren, die meist nur einen geringen Effekt haben [131].

Diese Problematik wird durch das „common variant/low penetrance“-Modell veranschaulicht, welches in diesem Fall die Wahrscheinlichkeit beschreibt, mittels genetischer Analysen ein Risikoallel zu identifizieren, das mit psychischen Erkrankungen assoziiert ist. Hierbei verhält sich die Effektgröße der Genvariante indirekt proportional zur Allelfrequenz [132]. In Bezug auf die „common disease-common variant“-Hypothese wird angenommen, dass die Anfälligkeit für häufige Krankheiten sich aus genetischen Varianten ableitet, die vergleichsweise häufig in der Bevölkerung auftreten, in der Regel nur kleine Effekte ausüben und nur schwer mit ausreichender Signifikanz erkannt werden [133]. Hierdurch lässt sich jedoch nur ein Teil der Erbllichkeit erklären.

In epidemiologischen Studien konnten weiterhin Umweltfaktoren (wie Belastung durch psychologischen oder physiologischen Stress) als Einflussfaktoren auf die psychische Morbidität festgestellt werden. So könnte Stress in frühen Lebensabschnitten das Gehirn dahingehend verändern, dass im späteren Lebensalter

Stress Auslöser einer solchen Erkrankung sein kann [132]; insbesondere scheint es ein gewisses Zeitfenster in Phasen „hoher synaptischer Reorganisation“ zu geben, in dem eine besondere Anfälligkeit hierfür besteht [134].

Genetische Varianten in miRNAs und miRNA-relevanten Genen können zur Entstehung von Krankheiten beitragen. Neben SNPs in Genen, die relevant für die Biogenese und Prozessierung von miRNAs sind [109], sind besonders Polymorphismen in miRNA-Genen und deren Ziel-Regionen von Interesse. In besonderem Maß offensichtlich auch jene SNPs, welche innerhalb der Seed-Region der miRNA oder der komplementären Region der mRNA liegen, da sie so direkt mit hoher Wahrscheinlichkeit die Effizienz der Bindung erhöhen bzw. herabsetzen (die online verfügbare Datenbank „PolymiRTS Database 3.0“ bietet die Möglichkeit, die Auswirkungen von SNPs auf den TargetScan context+ Score einer miRNA-mRNA-Interaktion zu beurteilen. Eine Suche nach SLC6A2 lieferte jedoch keine Resultate hinsichtlich der in dieser Arbeit untersuchten miRNAs). Auf diese Weise können SNPs Änderungen in der Gen- und Protein-Expression bewirken und so das Risiko für die Entstehung von Krankheiten beeinflussen [135, 136].

Assoziationsstudien unterliegen grundsätzlich einigen Limitationen, die auch hier berücksichtigt werden müssen. Neben einer ausreichend großen Fallzahl und korrekt diagnostizierten Individuen in der Fallgruppe ist eine adäquate Auswahl der Kontrollgruppe essentiell. Um genetische Unterschiede zwischen den Gruppen aufgrund z. B. ethnischer Unterschiede ausschließen zu können, sollten beide Gruppen in Punkten wie beispielsweise Herkunft und Alter keine wesentlichen Unterschiede aufweisen. Für valide Resultate sollten die Fall- und Kontrollgruppe aus derselben Population generiert werden. Im vorliegenden Fall wurden die Kontrollen nach Alter und Geschlecht angepasst. Dennoch zeigt sich ein signifikanter Altersunterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe (Alter Kontrollgruppe $M = 31,71$, $SD = 8,56$, $n = 511$; Alter Fallgruppe $M = 35,19$, $SD = 10,66$, $n = 506$; die

Effektstärke nach Cohen liegt bei $r = 0,18$ und entspricht damit einem schwachen Effekt).

Desweiteren sollte in einer zweiten, unabhängigen Replikationsstudie die Ergebnisse bestätigt werden [137]. Zwar lag eine ausreichend große Fallzahl vor, zudem wurde die Kontrollgruppe entsprechend der Fallgruppe gematched, dennoch wurden die Ergebnisse nicht durch eine Wiederholung in einem unabhängigen Kontrollsample bestätigt. Daher sind die Ergebnisse dieser Arbeit nur als explorativ zu betrachten.

4.3.2 Diskussion Ergebnisse Assoziationsstudie

Im Sinne einer explorativen Untersuchung wurden 17 SNPs, welche sich entweder in DNA-Regionen der untersuchten miRNAs bzw. innerhalb der 3'-UTR von *SLC6A2* befinden, einer Assoziationsanalyse unterzogen. Als Fallgruppe diente ein Kollektiv von deutschen Patienten mit der Diagnose „Panikstörung mit komorbider Agoraphobie“. Dabei zeigte sich unter anderem eine signifikante Assoziation des *MIR579*-assoziierten SNP rs2910931 und des *MIR3622B*-assoziierten SNP rs2582372 mit dem Vorliegen von PD/AG (vor Bonferroni-Korrektur für multiples Testen). Die Untersuchungen wurden nicht nur nach Diagnosestatus durchgeführt sondern auch hinsichtlich des Merkmals Angst, da eine vermehrte Angstsensitivität oder angstbezogene Kognitionen der Entwicklung einer Panikstörung vorausgehen können [138]. Hierbei ließ sich eine Assoziation von rs2910931 (Anzahl der minor T-Allele) mit dem Merkmal Angst im Sinne entsprechender ACQ bzw. ASI-Scores feststellen.

Nichtsdestoweniger ist für die weiteren Varianten eine Assoziation trotz eines statistisch negativen Resultats nicht grundsätzlich auszuschließen. Insgesamt zeigt sich Konkordanz der angstbezogenen Scores mit dem Diagnosestatus.

Berücksichtigt werden sollte weiterhin, dass die beiden hier verwendeten Angst-Scores nur Teilaspekte der Angst abbilden. Weitere Scores wie beispielsweise

zum Angstniveau (STAI – „State und Trait“) könnten in weiteren Untersuchungen Verwendung finden.

Zunehmend zeigen sich Hinweise auf die Bedeutung von miRNAs als Schlüsselfiguren in zentralnervösen Prozessen. Fast 50 % der bisher identifizierten miRNAs werden im Gehirn exprimiert und viele der Gene, die ihrer Regulierung unterliegen sind in grundlegenden Vorgängen wie z. B. der neuronalen Entwicklung und Plastizität involviert [139, 140]. miRNAs werden eine entscheidende Rolle in der Entstehung bzw. Modulation von Krankheiten beigemessen, indem sie die Translation bzw. Stabilität einer großen Zahl von mRNAs in einer umfassenden Art und Weise koordinieren.

Bis dato liegen kaum Untersuchungen vor, welche die Frage nach Assoziationen von SNPs in potentiellen miRNA-Regulatoren des Kandidatengens *SLC6A2* im Kontext von Angsterkrankungen untersuchen. Von den in der Arbeit vertieft untersuchten zehn miRNAs (Tabelle 3.3 auf S. 52) konnte nur für hsa-miR-330 in diesem Kontext passende Literatur gefunden werden. Hierbei zeigten sich in peripheren Vollblutproben von Patienten mit einer depressiven bzw. bipolaren Erkrankung veränderte Spiegel von hsa-mir-330-3p bzw. hsa-mir-330-5p [141].

In Bezug auf den SNP, welcher sich im Bereich der 3'-UTR von *SLC6A2* – spricht der vorrangigen miRNA-Binderegion – befindet, liefert eine aktuelle Assoziationsstudie [34] unter anderem folgende Erkenntnisse: verglichen mit gesunden Kontrollen, wies die Fallgruppe (bestehend aus Patienten mit Depressionen, Panikstörung, Bluthochdruck und posturalem Tachykardiesyndrom) ein signifikant häufiger vorkommendes T-Allel von rs7194256 (C/T), höhere arterielle Noradrenalinspiegel, Depressions- und Angst-Scores, Blutdruckwerte und Herzfrequenzen auf. Dieser Schluss kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht gezogen werden. Keine entsprechenden Unterschiede konnten von Marques et al. für rs15534 festgestellt werden, was in Einklang mit den Ergebnissen dieser Ar-

beit steht; interessanterweise konnten Marques et al. mittels bioinformatischer Methoden (miRNASNP 2.0, PolymiRTS Database und miRSNP Search) und anschließender Luciferase-Assays eine miRNA (miR-19a-3p) identifiziert werden, welche potentiell an diese Sequenz binden kann und potentiell in verschiedenen Stoffwechselwegen involviert zu sein scheint, welche Neurotransmission und Blutdruck beeinflussen [34]. Auch in Bezug auf diese Arbeit könnte weiterverfolgt werden, inwiefern durch 3'-UTR-*SLC6A2*-Varianten neue, veränderte oder defekte Bindungsstellen für miRNAs entstehen und welche Konsequenzen dies für miRNAs in neuronalen Stoffwechselwegen hat. Online verfügbare Datenbanken wie z. B. PolymiRTS 3.0 [142], miRNASNP 2.0 [143] oder MirSNP [144] versuchen ebendiese Veränderungen zu berechnen. Dies bietet eine Grundlage, um in anschließenden Versuchen Auswirkungen in der Expression neuer potentieller miRNAs in Fall-Kontroll-Studien zu untersuchen und zu sehen, in welchen Stoffwechselwegen diese beteiligt sind.

Verschiedene Studien belegen eine ausgeprägte Korrelation zwischen der Expression des Hostgens und der miRNA [145]. Unter anderem liegen rs2910931 bzw. *MIR579* in einem Protein-kodierenden Hostgen, in diesem Fall „zinc finger RNA binding protein“. Durch alternative Polyadenylierung von hsa-miR-579 scheint in diesem Fall eine Regulierung der Expression des Hostgens zu bestehen [146]. Im Speziellen zeigten sich erhöhte hsa-miR-579 Spiegel in einer Studie, bei Patienten mit Bevacizumab-induzierter Kardiotoxizität [147]. Bisherige Studien lieferten für *MIR579* bezüglich neuronaler Prozesse bisher jedoch keine wesentliche funktionelle Rolle. Untersuchungen von miRNA-Expression im Rahmen der Gehirn-Entwicklung zeigten keine relevanten Hinweise bezüglich der Expression von *MIR579* [148].

Wie bereits beschrieben befindet sich rs2910931 innerhalb der Promotor-Region von *MIR579*. Eine weiterführende Untersuchung liegt in der Untersuchung der

Promotoraktivität, wie es beispielsweise von Hommers et al. mittels weiterer Luciferase-Versuche durchgeführt wurde [115]: hierbei ließ sich eine signifikant höhere Luciferase-Aktivität für das (minor) T-Allel im Vergleich zum (major) A-Allel feststellen, was eine erhöhte Expression von von *MIR579* und *hsa-mir-579-3p* und damit eine verminderte Expression *SLC6A2* nahelegt. Weiterführende dort angestellte *in silico*-Prädiktionen bezüglich der 3'-UTR-Bindung von *hsa-mir-579-3p* führen zu vergleichsweise hohen Scores unter anderem für weitere potentiell diskutierte Angst-Kandidatengene wie *GLRB*, *HTR2B*, und *NPY5R* [10, 110, 149, 150]. Anschließende Luciferase-Assays zeigten immerhin eine signifikante Repression für *HTR2B* und *NPY5R* [115], was die Überlegung einer Modulation ganzer Angst-Netzwerke unterstützt und weitere, größer angelegte systematische Untersuchungen nahelegt.

Im Allgemeinen gilt die individuelle genetische Variabilität von miRNA-Genen als vergleichsweise gering, da viele regulativ bedeutende Funktionen einnehmen und einen vergleichsweise hohen Grad an Konservierung aufweisen [151]. Sequenzierung von miRNA oder ihren Bindungsstellen könnte hier zur weiteren Aufklärung von seltenen Varianten beitragen.

4.4 Ausblick

Bei Angsterkrankungen lässt sich wie bei vielen psychischen Erkrankungen neben Umwelteinflüssen und psychosozialen Faktoren eine komplexe genetische Komponente feststellen. Im Gegensatz zu monogenen Krankheiten, basieren Angsterkrankungen nicht auf den klassischen Mendelschen Erbgeln, sondern vielmehr einem komplexen Vererbungsmuster mit weiteren, teils noch nicht identifizierten Komponenten. Zwar sind Mutationen von Genen bekannt, welche mit einer erhöhten Anfälligkeit für psychische Erkrankungen wie z. B. Schizophrenie einhergehen [152], allerdings erklären diese nur einen Teil der Erbllichkeit und

wurden längst nicht bei allen Krankheiten, insbesondere noch nicht mit großer Sicherheit für Angsterkrankungen entdeckt. Das Risiko eines Einzelnen eine solche Erkrankung zu entwickeln ist nicht ohne Weiteres ableitbar. Versuche wie in dieser Arbeit, Zusammenhänge zu einer Krankheit über SNPs in einem *a priori* definierten Kandidatengen des monoaminergen Systems herzustellen, können lediglich erste Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang darstellen.

Weiterhin führen sowohl erbliche, in der DNA-Sequenz feststellbare Veränderungen wie beispielsweise SNPs, Deletionen, Amplifikationen etc. als auch Umwelteinflüsse über epigenetische Phänomene – z. B. DNA-Methylierung oder durch posttranskriptionelle Regulation mittels miRNAs – zu Modifikationen der Expression von Genen. Dies kann sich in einer veränderten Gehirnstruktur bzw. -funktion auswirken und so zu psychischen Erkrankungen führen. Hier nehmen miRNAs als Vermittler zahlreicher zellulärer Prozesse eine interessante Rolle ein, und könnten ein fehlendes Glied in der komplexen genetischen Ätiologie von Angsterkrankungen darstellen [132, 134]. Zunehmend verdichten sich Hinweise, dass auch eine veränderte Methylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion von miRNAs entscheidend zu dysregulierten miRNA-Konzentrationen beiträgt, was über die damit verbundene Modulation ganzer zellulärer Netzwerke die Entstehung verschiedener Krankheiten begünstigen oder gar verursachen kann. Auch umgekehrt können miRNAs zur Inhibition von DNA-Methyltransferasen führen, und auf diese Weise das Methylierungsmuster des gesamten Genoms beeinflussen [153]. Untersuchungen, welche dies auch im Kontext von Angsterkrankungen durchleuchten, beispielsweise inwiefern eine abweichende Methylierung von miRNA-Promotoren kausal mit der Entwicklung einer Form von Angsterkrankung in Zusammenhang zu bringen ist, könnten weitere relevante Aspekte liefern.

Zwar gibt es gute Gründe für die Fokussierung auf *SLC6A2* als mögliches Suszeptibilitäts- bzw. Kandidatengen von Angsterkrankungen, dennoch müssen

auch Studien berücksichtigt werden, die NET bzw. *SLC6A2* nur einen geringen Stellenwert als Kandidatengen bei Angsterkrankungen einräumen [10].

Die Suche nach Kandidatengen im Bereich psychischer Erkrankungen unterliegt einer großen Komplexität. Zwischen vielen psychiatrischen Diagnosen existieren große Überschneidungen bei den beobachtbaren Symptomen, was die eindeutige Diagnosefindung häufig erschwert. Eine klinische psychiatrische Diagnose könnte vielmehr als Endstadium verschiedenster neurobiologischer Funktionsstörungen oder pathologischer Prozesse unterschiedlicher Ätiologie betrachtet werden. Potentielle Diskrepanzen zwischen im Grunde als verschieden zu betrachtenden Patientengruppen werden so auch in der Studienpopulation verschleiert und die Aussagekraft daraus abgeleiteter Analysen gemindert [154]. Daraus resultierend stellt die Verwendung von sogenannten Endophänotypen einen alternativen Ansatz dar. Diese beschreiben neurophysiologische Gemeinsamkeiten, die zeitlich stabil und direkter genetisch beeinflusst sind als die Krankheitsphänotypen [155]. Endophänotypen sind theoretisch direkter mit dem eigentlichen genetischen Defizit verbunden als die diagnostischen Phänotypen selbst. Konkret könnte dies im Kontext von Angsterkrankungen durch neurobiologische Marker wie sympathikotone Reaktionen, Kohlendioxidüberempfindlichkeit oder z. B. Amygdala-Aktivität in einer funktionellen Magnetresonanztomographie erfolgen [156, 157]. Dies wurde beispielsweise in [115] implementiert: ausgehend von den Daten der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern Risikogenotypen die noradrenerge zentrale Angstverarbeitung sowie periphere kardiovaskuläre Parameter modulierten. Hierbei wurde die neuronale Aktivierung während einer Angstkonditionierung mittels funktioneller Magnetresonanztomographie ermittelt. Es zeigte sich unter anderem in Bezug auf rs2910931 in gesunden Individuen mit mindestens einem T-Allel ein spezifisches cerebrales Aktivierungsmuster mit noradreneger Aktivierung im Mittelhirn und limbischen System als Ausdruck der gesteigerten Angst. Anschließende Provokationstests mittels Behavioral-Avoidance-Test in einer Gruppe von Patien-

ten mit Panikerkrankung kamen beim Vorhandensein zweier T-Allele in Bezug auf rs2910931 zu einem kongruenten Ergebnis.

Einen weiterführenden Ansatz könnten Untersuchungen darstellen, welche nicht von einem einzelnen *a priori* definierten Kandidatengen ausgehen, sondern vielmehr gesamte Gen-Netzwerke im Kontext von Angsterkrankung, beispielweise Gen-Netzwerke des monoaminergen System oder experimentell untersuchte Kandidatengene, als Basis nehmen und auf gemeinsame miRNA-Regulatoren zu screenen. Zudem könnte ein Ansatz gewählt werden, welcher initial von einer oder mehreren miRNAs ausgeht, um hierdurch potentiell beeinflusste Angst-Gene zu identifizieren.

Einen weiteren Schritt stellt eine Ausweitung der *in silico*-Prädiktionen von miRNAs, weg von der klassischen Limitation 3'-UTR, hin zu einer transkriptomweiten Untersuchung dar. So könnte etwa mittels quervernetzender Immunopräzipitationsmethoden in Kombination mit Hochdurchsatz-Verfahren wie z. B. AGO-HITS-CLIP der hier verwendete *in silico*-Ansatz (mit seiner hohen Rate an falsch-positiven Befunden) plus anschließendem Luciferase-Assay überwunden werden [158, 159], um „relevantere“ miRNA-Bindungsstellen zu indentifizieren.

Relevanz liegt ebenso in der Rolle von miRNAs als potentielles pharmakologisches Ziel. Erste Erfolge konnten hier bereits insbesondere bei onkologischen Erkrankungen erzielt werden: im Rahmen von Bestrebungen, Spiegel von miRNAs zu beeinflussen, welche direkt mit der Tumorproliferation in Zusammenhang stehen, wurden Oligonukleotide entwickelt, die mit endogenen miRNAs konkurrieren und so zu einem verminderten Tumorstadium führen [160]. Ein weiterer Ansatz stellt die Überexpression bzw. die „Ersatztherapie“ mittels miRNA-mimcis dar – doppelsträngige RNA-Moleküle, welche reife endogene miRNAs imitieren und so Einfluss auf die Genexpression nehmen [161]. Im Gegensatz hierzu stellen sog. „Antagomire“ kurze synthetische RNA-Moleküle mit Sequenz-Komplementarität

zur entsprechenden Ziel-miRNA dar, wodurch eine Inhibierung und damit Unterbindung der Funktion erreicht werden kann [162].

Eine Schwierigkeit der Anwendung besteht und anderem in der Entwicklung geeigneter Vehikel; gerade bei neuropsychiatrischen Krankheiten spielt die zu überwindende Blut-Hirn-Schranke eine große Rolle. Gerade hier stellen miRNAs mit ihren vielfältig modulierenden Effekten einen möglichen Angriffspunkt dar [161, 163]. Inwiefern diese Methoden – sei es durch Inhibition oder Imitation von miRNAs – auch bei Angsterkrankungen Anwendung finden können, ist Gegenstand künftiger Untersuchungen [140, 164].

Insgesamt scheint es somit ein mehrschichtiges Gefüge aus genetischen und epigenetischen Faktoren, Bewältigungsstrategien und Umweltfaktoren zu geben, die in einem komplexen Zusammenspiel das Risiko beeinflussen, eine Angsterkrankung zu entwickeln [134]. miRNAs stellen in diesen komplexen Prozessen eine interessante und vor allem relevante Stellgröße dar, die es in weiterführenden Untersuchungen zu berücksichtigen gilt.

5 Zusammenfassung

Angsterkrankungen sind häufige Krankheitsbilder mit bislang nicht vollständig geklärter, multifaktorieller Ätiologie. Neben Umwelt- und psychosozialen Faktoren zeigen Studien eine signifikante familiäre Häufung und lassen eine genetische Komponente mit einer Heritabilität in einem Bereich von 30-60 % vermuten. Da hierbei am ehesten von einem komplexen Zusammenspiel verschiedenster Gene mit unterschiedlicher Relevanz auszugehen ist, stellen miRNAs eine bedeutende Größe dar, da sie es vermögen auf transkriptioneller Ebene Einfluss auf die Regulierung einer Vielzahl von Genen zu nehmen.

Verschiedene Aspekte liefern Hinweise darauf, dass eine Neurotransmitterdysregulation eine wichtige Komponente in der Pathogenese von Angsterkrankungen einnimmt – insbesondere veränderte noradrenerge Signalwege sind hierbei entscheidend beteiligt. Dies macht den Noradrenalin-Transporter bzw. *SLC6A2* zu einem interessanten Kandidatengen, und stellt die Bezugsgröße der angestellten Untersuchungen in dieser Arbeit dar. miRNAs, welche die *SLC6A2*-Expression modulieren, können somit Einfluss auf zentrale Verarbeitungswege von Angst nehmen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden potentielle miRNA-Regulatoren von *SLC6A2* *in silico* ermittelt und in einem weiteren Schritt *in vitro* überprüft. Zehn der miRNAs (hsa-miR-378g, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-4781-5p, hsa-miR-664b-3p, hsa-miR-4715-3p, hsa-miR-579-3p, hsa-miR-3921, hsa-miR-3622b-5p, hsa-miR-4773, hsa-miR-532-3p) zeigten hierbei eine relevante Abnahme der Luciferase-Aktivität als Hinweis auf ihre funktionelle Relevanz und stellen damit die Basis der nachfolgenden Untersuchungen dar.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Einzelbasenpolymorphismen im Bereich der zuvor ermittelten miRNA-Gene sowie eines SNP innerhalb der 3'-UTR von *SLC6A2* mittels Fall-Kontroll-Studie in einer Population von Patienten mit Panikstörung und entsprechenden Kontrollen untersucht. Eine nominelle Assoziation ließ sich für das (minor) T-Allel von rs2910931 (stromaufwärts von *MIR579*) ($p_{\text{allel}} = 0,004$) sowie das (major) A-Allel von rs2582372 ($p_{\text{allel}} = 0,023$) feststellen. In Einklang hiermit ließ sich weiterhin für rs2910931 eine signifikante Assoziation zwischen der Anzahl der (minor) T-Allele und dem ASI-Wert ($\beta = 0,371$, $p = 0,029$, 95 %-CI 0,039-0,702) sowie dem ACQ-Wert ($\beta = 0,012$, $p = 0,041$, 95 %-CI 0,000-0,023) ermitteln.

Somit zeigt sich eine Einflussnahme der genetischen Variante um *MIR579* auf die Feinmodulation der Noradrenalin-Homöostase als möglichem ätiopathogenetischen Faktor von Angsterkrankungen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] H. Dilling, H. J. Freyberger, W. Mombour und E. Schulte-Markwort. „Internationale Klassifikation psychischer Störungen“. In: *Lehrbuch der Verhaltenstherapie*. 2014, S. 181–200.
- [2] S. Reiss, R. A. Peterson, D. M. Gursky und R. J. McNally. „Anxiety sensitivity, anxiety frequency and the prediction of fearfulness“. In: *Behav. Res. Ther.* 24.1 (1986), S. 1–8.
- [3] A. Bernstein, M. J. Zvolensky, M. J. Zvolensky und N. B. Schmidt. „Laboratory Test of a Novel Structural Model of Anxiety Sensitivity and Panic Vulnerability“. In: *Behav. Ther.* 40.2 (Juni 2009), S. 171–180.
- [4] D. L. Chambless, G. C. Caputo, P. Bright und R. Gallagher. „Assessment of fear of fear in agoraphobics: The Body Sensations Questionnaire and the Agoraphobic Cognitions Questionnaire.“ In: *J. Consult. Clin. Psychol.* 52.6 (Dez. 1984), S. 1090–1097.
- [5] F. Jacobi u. a. „Psychische Störungen in der Allgemeinbevölkerung“. In: *Nervenarzt* 85.1 (Jan. 2014), S. 77–87.
- [6] C. J. L. Murray. „The State of US Health, 1990-2010“. In: *JAMA* 310.6 (Aug. 2013), S. 591.
- [7] J. Olesen, A. Gustavsson, M. Svensson, H.-U. Wittchen und B. Jönsson. „The economic cost of brain disorders in Europe“. In: *Eur. J. Neurol.* 19.1 (Jan. 2012), S. 155–162.
- [8] J. M. Hettema, M. C. Neale und K. S. Kendler. „A Review and Meta-Analysis of the Genetic Epidemiology of Anxiety Disorders“. In: *Am. J. Psychiatry* 158.10 (Okt. 2001), S. 1568–1578.
- [9] K. Domschke. „Prädiktive Faktoren bei Angststörungen“. In: *Nervenarzt* 85.10 (2014), S. 1263–1268.
- [10] S. M. Meier und J. Deckert. „Genetics of Anxiety Disorders“. In: *Curr. Psychiatry Rep.* 21.3 (März 2019), S. 16.
- [11] S. Moylan, F. N. Jacka, J. a. Pasco und M. Berk. „Cigarette smoking, nicotine dependence and anxiety disorders: a systematic review of population-based, epidemiological studies“. In: *BMC Med.* 10.1 (2012), S. 123.
- [12] B. Klauke, J. Deckert, A. Reif, P. Pauli und K. Domschke. „Life events in panic disorder-an update on candidate stressors“. In: *Depress. Anxiety* 730.December 2009 (2010), n/a–n/a.
- [13] T. M. Murphy, A. O’Donovan, N. Mullins, C. O’Farrelly, A. McCann und K. Malone. „Anxiety is associated with higher levels of global DNA methylation and altered expression of epigenetic and interleukin-6 genes“. In: *Psychiatr. Genet.* 25.2 (Apr. 2015), S. 71–78.

- [14] A. Bystritsky. „Treatment-resistant anxiety disorders“. In: *Mol. Psychiatry* 11.9 (Sep. 2006), S. 805–814.
- [15] L. A. Schwarz und L. Luo. „Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System“. In: *Curr. Biol.* 25.21 (Nov. 2015), R1051–R1056.
- [16] H. Bönisch und M. Brüss. „The norepinephrine transporter in physiology and disease“. In: *Handb. Exp. Pharmacol.* 175.175 (Jan. 2006), S. 485–524.
- [17] T. Pacholczyk, R. D. Blakely und S. G. Amara. „Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter“. In: *Nature* 350.6316 (März 1991), S. 350–354.
- [18] P. Porzgen, H. Bonisch und M. Bruss. „Molecular Cloning and Organization of the Coding Region of the Human Norepinephrine Transporter Gene“. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215.3 (Okt. 1995), S. 1145–1150.
- [19] N. H. Chen, M. E. a. Reith und M. W. Quick. *Synaptic uptake and beyond: The sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6*. Feb. 2004.
- [20] A. W. Goddard, S. G. Ball, J. Martinez, M. J. Robinson, C. R. Yang, J. M. Russell und A. Shekhar. „Current perspectives of the roles of the central norepinephrine system in anxiety and depression“. In: *Depress. Anxiety* 27.4 (Apr. 2010), S. 339–350.
- [21] K. Ono u. a. „Epidemiological evidence of an association between SLC6A2 gene polymorphism and hypertension.“ In: *Hypertens. Res.* 26.9 (2003), S. 685–689.
- [22] M. P. Schlaich u. a. „Sympathetic Augmentation in Hypertension: Role of Nerve Firing, Norepinephrine Reuptake, and Angiotensin Neuromodulation“. In: *Hypertension* 43.2 (Feb. 2004), S. 169–175.
- [23] J. R. Shannon, N. L. Flattem, J. Jordan, G. Jacob, B. K. Black, I. Biaggioni, R. D. Blakely und D. Robertson. „Orthostatic Intolerance and Tachycardia Associated with Norepinephrine-Transporter Deficiency“. In: *N. Engl. J. Med.* 342.8 (Feb. 2000), S. 541–549.
- [24] A. W. Khan, S. J. Corcoran, M. Esler und A. El-Osta. „Epigenomic changes associated with impaired norepinephrine transporter function in postural tachycardia syndrome“. In: *Neurosci. Biobehav. Rev.* (Juni 2016).
- [25] A. Z. Scalco, M. Z. Scalco, J. B. S. Azul und F. Lotufo Neto. „Hypertension and depression“. In: *Clinics* 60.3 (Juni 2005), S. 241–250.
- [26] E. E. Benarroch. „Postural Tachycardia Syndrome: A Heterogeneous and Multifactorial Disorder“. In: *Mayo Clin. Proc.* 87.12 (Dez. 2012), S. 1214–1225.
- [27] B. Dell’Osso, M. C. Palazzo, L. Oldani und a. C. Altamura. „The Noradrenergic Action in Antidepressant Treatments: Pharmacological and Clinical Aspects“. In: *CNS Neurosci. Ther.* 17.6 (Dez. 2011), S. 723–732.

- [28] M. E. Alvarenga, J. C. Richards, G. Lambert und M. D. Esler. „Psychophysiological Mechanisms in Panic Disorder: A Correlative Analysis of Noradrenaline Spillover, Neuronal Noradrenaline Reuptake, Power Spectral Analysis of Heart Rate Variability, and Psychological Variables“. In: *Psychosom. Med.* 68.1 (Jan. 2006), S. 8–16.
- [29] J. D. Bremner, J. H. Krystal, S. M. Southwick und D. S. Charney. „Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: II. Clinical studies.“ In: *Synapse* 23.1 (Mai 1996), S. 39–51.
- [30] D. S. Charney. „Noradrenergic Function in Panic Anxiety“. In: *Arch. Gen. Psychiatry* 41.8 (Aug. 1984), S. 751.
- [31] Y. J. Lee u. a. „Norepinephrine transporter (NET) promoter and 5'-UTR polymorphisms: association analysis in panic disorder“. In: *Neurosci. Lett.* 377.1 (März 2005), S. 40–43.
- [32] H. N. Buttenschøn u. a. „The norepinephrine transporter gene is a candidate gene for panic disorder“. In: *J. Neural Transm.* 118.6 (Juni 2011), S. 969–976.
- [33] T. Otowa u. a. „Replication of a genome-wide association study of panic disorder in a Japanese population“. In: *J. Hum. Genet.* 55.2 (Feb. 2010), S. 91–96.
- [34] F. Z. Marques u. a. „A polymorphism in the norepinephrine transporter gene is associated with affective and cardiovascular disease through a microRNA mechanism“. In: *Mol. Psychiatry* 22.1 (Jan. 2017), S. 134–141.
- [35] M. Esler. „The neuronal noradrenaline transporter, anxiety and cardiovascular disease“. In: *J. Psychopharmacol.* 20.4 suppl (Juli 2006), S. 60–66.
- [36] R. Bayles, E. K. Baker, J. B. M. Jowett, D. Barton, M. Esler, A. El-Osta und G. Lambert. „Methylation of the SLC6a2 Gene Promoter in Major Depression and Panic Disorder“. In: *PLoS One* 8.12 (Dez. 2013). Hrsg. von J. Tost.
- [37] R. C. Lee, R. L. Feinbaum und V. Ambros. „The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*“. In: *Cell* 75.5 (Dez. 1993), S. 843–854.
- [38] B. Wightman, I. Ha und G. Ruvkun. „Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*“. In: *Cell* 75.5 (Dez. 1993), S. 855–862.
- [39] B. J. Reinhart, F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz und G. Ruvkun. „The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*.“ In: *Nature* 403.6772 (Feb. 2000), S. 901–906.
- [40] A. E. Pasquinelli u. a. „Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA.“ In: *Nature* 408.6808 (Nov. 2000), S. 86–89.

- [41] B. J. Reinhart. „MicroRNAs in plants“. In: *Genes Dev.* 16.13 (Juli 2002), S. 1616–1626.
- [42] D. P. Bartel. „MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.“ In: *Cell* 116.2 (Jan. 2004), S. 281–97.
- [43] M. D. Jansson und A. H. Lund. „MicroRNA and cancer“. In: *Mol. Oncol.* 6.6 (Dez. 2012), S. 590–610.
- [44] C. Kanellopoulou und S. Monticelli. „A role for microRNAs in the development of the immune system and in the pathogenesis of cancer“. In: *Semin. Cancer Biol.* 18.2 (Apr. 2008), S. 79–88.
- [45] A. Erson und E. Petty. „MicroRNAs in development and disease“. In: *Clin. Genet.* 74.4 (Aug. 2008), S. 296–306.
- [46] M. Lu, Q. Zhang, M. Deng, J. Miao, Y. Guo, W. Gao und Q. Cui. „An Analysis of Human MicroRNA and Disease Associations“. In: *PLoS One* 3.10 (Okt. 2008). Hrsg. von M. Isalan, e3420.
- [47] B. P. Lewis, C. B. Burge und D. P. Bartel. „Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets“. In: *Cell* 120.1 (Jan. 2005), S. 15–20.
- [48] A. Kozomara und S. Griffiths-Jones. „MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data“. In: *Nucleic Acids Res.* 42.D1 (2014), S. 68–73.
- [49] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek und V. N. Kim. „MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II“. In: *EMBO J.* 23.20 (Okt. 2004), S. 4051–4060.
- [50] Y. Zeng, R. Yi und B. R. Cullen. „Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha“. In: *EMBO J.* 24.1 (Jan. 2005), S. 138–148.
- [51] R. I. Gregory, K.-P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch und R. Shiekhattar. „The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs“. In: *Nature* 432.7014 (Nov. 2004), S. 235–240.
- [52] A. M. Denli, B. B. J. Tops, R. H. a. Plasterk, R. F. Ketting und G. J. Hannon. „Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex“. In: *Nature* 432.7014 (Nov. 2004), S. 231–235.
- [53] V. N. Kim. „MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export“. In: *Trends Cell Biol.* 14.4 (Apr. 2004), S. 156–159.
- [54] M. Ha und V. N. Kim. „Regulation of microRNA biogenesis“. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15.8 (Juli 2014), S. 509–524.
- [55] S. Ro, C. Park, D. Young, K. M. Sanders und W. Yan. „Tissue-dependent paired expression of miRNAs“. In: *Nucleic Acids Res.* 35.17 (Aug. 2007), S. 5944–5953.
- [56] J.-S. Yang, M. D. Phillips, D. Betel, P. Mu, A. Ventura, A. C. Siepel, K. C. Chen und E. C. Lai. „Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species“. In: *RNA* 17.2 (Feb. 2011), S. 312–326.

- [57] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory und S. Diederichs. „Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation“. In: *Nat. Cell Biol.* (2009).
- [58] T. Du und P. D. Zamore. „microPrimer: the biogenesis and function of microRNA.“ In: *Development* 132.21 (2005), S. 4645–4652.
- [59] V. N. Kim. „MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing“. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6.5 (Mai 2005), S. 376–385.
- [60] G. Hutvagner. „A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex“. In: *Science (80-.)*. 297.5589 (Sep. 2002), S. 2056–2060.
- [61] Y. Zeng und B. R. Cullen. „Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells“. In: *RNA* 9.1 (Jan. 2003), S. 112–123.
- [62] J. G. Doench. „siRNAs can function as miRNAs“. In: *Genes Dev.* 17.4 (Feb. 2003), S. 438–442.
- [63] H. Guo, N. T. Ingolia, J. S. Weissman und D. P. Bartel. „Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels“. In: *Nature* 466.7308 (Aug. 2010), S. 835–840.
- [64] S. W. Eichhorn u. a. „mRNA Destabilization Is the Dominant Effect of Mammalian MicroRNAs by the Time Substantial Repression Ensues“. In: *Mol. Cell* 56.1 (2014), S. 104–115.
- [65] E. Huntzinger und E. Izaurralde. „Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay“. In: *Nat. Rev. Genet.* 12.2 (Feb. 2011), S. 99–110.
- [66] J. E. Braun, E. Huntzinger und E. Izaurralde. „A Molecular Link between miRISCs and Deadenylation Provides New Insight into the Mechanism of Gene Silencing by MicroRNAs“. In: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.12 (Dez. 2012), a012328–a012328.
- [67] S. Djuranovic, A. Nahvi und R. Green. „miRNA-Mediated Gene Silencing by Translational Repression Followed by mRNA Deadenylation and Decay“. In: *Science (80-.)*. 336.6078 (Apr. 2012), S. 237–240.
- [68] R. Parker und U. Sheth. „P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation“. In: *Mol. Cell* 25.5 (März 2007), S. 635–646.
- [69] S. N. Bhattacharyya, R. Habermacher, U. Martine, E. I. Closs und W. Filipowicz. „Relief of microRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress“. In: *Cell* 125.6 (Juni 2006), S. 1111–1124.
- [70] T. Treiber, N. Treiber und G. Meister. „Regulation of microRNA biogenesis and function“. In: *Thromb. Haemost.* 107.4 (Feb. 2012), S. 605–610.
- [71] M. P. Gantier u. a. „Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation“. In: *Nucleic Acids Res.* 39.13 (Juli 2011), S. 5692–5703.

- [72] A. Baccharini, H. Chauhan, T. J. Gardner, A. D. Jayaprakash, R. Sachidanandam und B. D. Brown. „Kinetic analysis reveals the fate of a MicroRNA following target regulation in mammalian cells“. In: *Curr. Biol.* 21.5 (2011), S. 369–376.
- [73] S. Griffiths-Jones. „miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature“. In: *Nucleic Acids Res.* 34.90001 (Jan. 2006), S. D140–D144.
- [74] S. Griffiths-Jones, H. K. Saini, S. van Dongen und A. J. Enright. „miRBase: tools for microRNA genomics“. In: *Nucleic Acids Res.* 36.Database (Dez. 2007), S. D154–D158.
- [75] A. Kozomara und S. Griffiths-Jones. „miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data“. In: *Nucleic Acids Res.* 39.Database (Jan. 2011), S. D152–D157.
- [76] V. Ambros u. a. „A uniform system for microRNA annotation.“ In: *RNA* 9.3 (März 2003), S. 277–279.
- [77] J. A. Weber, D. H. Baxter, S. Zhang, D. Y. Huang, K. How Huang, M. Jen Lee, D. J. Galas und K. Wang. „The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids“. In: *Clin. Chem.* 56.11 (Nov. 2010), S. 1733–1741.
- [78] M. A. Cortez, C. Bueso-Ramos, J. Ferdin, G. Lopez-Berestein, A. K. Sood und G. A. Calin. „MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers“. In: *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8.8 (Juni 2011), S. 467–477.
- [79] C. Théry. „Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications“. In: *F1000 Biol. Rep.* 3.July (Juli 2011), S. 15.
- [80] K. C. Vickers, B. T. Palmisano, B. M. Shoucri, R. D. Shamburek und A. T. Remaley. „MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins“. In: *Nat. Cell Biol.* 13.4 (Apr. 2011), S. 423–433.
- [81] J. D. Arroyo u. a. „Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma.“ In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108.12 (2011), S. 5003–5008.
- [82] C. H. Lawrie u. a. „Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma“. In: *Br. J. Haematol.* 141.5 (Juni 2008), S. 672–675.
- [83] N. Rosenfeld u. a. „MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin“. In: *Nat. Biotechnol.* 26.4 (Apr. 2008), S. 462–469.
- [84] C.-Y. Lai u. a. „MicroRNA Expression Aberration as Potential Peripheral Blood Biomarkers for Schizophrenia“. In: *PLoS One* 6.6 (Juni 2011). Hrsg. von M. Uddin, e21635.
- [85] H. Rong u. a. „MicroRNA-134 plasma levels before and after treatment for bipolar mania“. In: *J. Psychiatr. Res.* 45.1 (Jan. 2011), S. 92–95.
- [86] L. Tan u. a. „Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer’s disease“. In: *J. Neurol. Sci.* 336.1-2 (Jan. 2014), S. 52–56.

- [87] P. B. Danborg, A. H. Simonsen, G. Waldemar und N. H. H. Heegaard. „The potential of microRNAs as biofluid markers of neurodegenerative diseases – a systematic review“. In: *Biomarkers* 19.4 (Juni 2014), S. 259–268.
- [88] P. M. Gaughwin, M. Ciesla, N. Lahiri, S. J. Tabrizi, P. Brundin und M. Bjorkqvist. „Hsa-miR-34b is a plasma-stable microRNA that is elevated in pre-manifest Huntington’s disease“. In: *Hum. Mol. Genet.* 20.11 (Juni 2011), S. 2225–2237.
- [89] S. E. Lakhan, K. Vieira und E. Hamlat. „Biomarkers in psychiatry: drawbacks and potential for misuse“. In: *Int. Arch. Med.* 3.1 (2010), S. 1.
- [90] L. G. Hommers, K. Domschke und J. Deckert. „Heterogeneity and Individuality: microRNAs in Mental Disorders“. In: *J. Neural Transm.* 122.1 (Jan. 2015), S. 79–97.
- [91] M. Muiños-Gimeno u. a. „Human microRNAs miR-22, miR-138-2, miR-148a, and miR-488 Are Associated with Panic Disorder and Regulate Several Anxiety Candidate Genes and Related Pathways“. In: *Biol. Psychiatry* 69.6 (März 2011), S. 526–533.
- [92] K. P. Jensen, H. R. Kranzler, M. B. Stein und J. Gelernter. „The effects of a MAP2K5 microRNA target site SNP on risk for anxiety and depressive disorders“. In: *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 165.2 (März 2014), S. 175–183.
- [93] S. Katsuura u. a. „MicroRNAs miR-144/144* and miR-16 in peripheral blood are potential biomarkers for naturalistic stress in healthy Japanese medical students“. In: *Neurosci. Lett.* 516.1 (Mai 2012), S. 79–84.
- [94] M. Honda u. a. „Chronic Academic Stress Increases a Group of microRNAs in Peripheral Blood“. In: *PLoS One* 8.10 (Okt. 2013). Hrsg. von H. Zhang, e75960.
- [95] H. M. Shein und J. F. Enders. „Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics.“ In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48.1961 (Juli 1962), S. 1164–72.
- [96] J. Brennecke, A. Stark, R. B. Russell und S. M. Cohen. „Principles of MicroRNA–Target Recognition“. In: *PLoS Biol.* 3.3 (Feb. 2005). Hrsg. von James C. Carrington, e85.
- [97] S. M. Peterson, J. A. Thompson, M. L. Ufkin, P. Sathyanarayana, L. Liaw und C. B. Congdon. „Common features of microRNA target prediction tools“. In: *Front. Genet.* 5 (2014), S. 23.
- [98] S. Ekimler und K. Sahin. „Computational Methods for MicroRNA Target Prediction“. In: *Genes (Basel).* 5.3 (Aug. 2014), S. 671–683.
- [99] D. P. Bartel. „MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions“. In: *Cell* 136.2 (Jan. 2009), S. 215–233.
- [100] A. Grimson, K. K.-H. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim und D. P. Bartel. „MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing“. In: *Mol. Cell* 27.1 (Juli 2007), S. 91–105.

- [101] T. Saito und P. Sætrum. „MicroRNAs – targeting and target prediction“. In: *N. Biotechnol.* 27.3 (Juli 2010), S. 243–249.
- [102] R. C. Friedman, K. K.-H. Farh, C. B. Burge und D. P. Bartel. „Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs“. In: *Genome Res.* 19.1 (Okt. 2008), S. 92–105.
- [103] P. Sethupathy, M. Megraw und A. G. Hatzigeorgiou. „A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets“. In: *Nat. Methods* 3.11 (Okt. 2006), S. 881–886.
- [104] U. Muckstein, H. Tafer, J. Hackermuller, S. H. Bernhart, P. F. Stadler und I. L. Hofacker. „Thermodynamics of RNA-RNA binding“. In: *Bioinformatics* 22.10 (Mai 2006), S. 1177–1182.
- [105] I. L. Hofacker. „How microRNAs choose their targets“. In: *Nat. Genet.* 39.10 (Okt. 2007), S. 1191–1192.
- [106] M. Kertesz, N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul und E. Segal. „The role of site accessibility in microRNA target recognition“. In: *Nat. Genet.* 39.10 (Okt. 2007), S. 1278–1284.
- [107] D. M. Garcia, D. Baek, C. Shin, G. W. Bell, A. Grimson und D. P. Bartel. „Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of Isy-6 and other microRNAs“. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18.10 (Sep. 2011), S. 1139–1146.
- [108] N. Wong und X. Wang. „miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations“. In: *Nucleic Acids Res.* 43.D1 (Jan. 2015), S. D146–D152.
- [109] E. Maffioletti, D. Tardito, M. Gennarelli und L. Bocchio-Chiavetto. „Microspies from the brain to the periphery: new clues from studies on microRNAs in neuropsychiatric disorders“. In: *Front. Cell. Neurosci.* 8.March (März 2014), S. 1–16.
- [110] J. Deckert u. a. „GLRB allelic variation associated with agoraphobic cognitions, increased startle response and fear network activation: a potential neurogenetic pathway to panic disorder“. In: *Mol. Psychiatry* 22 (Feb. 2017), S. 1431–1439.
- [111] U. Lueken u. a. „Modulation of defensive reactivity by GLRB allelic variation: converging evidence from an intermediate phenotype approach“. In: *Transl. Psychiatry* 7.9 (Sep. 2017), e1227.
- [112] J. Richter u. a. „Dynamics of Defensive Reactivity in Patients with Panic Disorder and Agoraphobia: Implications for the Etiology of Panic Disorder“. In: *Biol. Psychiatry* 72.6 (Sep. 2012), S. 512–520.
- [113] A. T. Gloster u. a. „Psychological treatment for panic disorder with agoraphobia: A randomized controlled trial to examine the role of therapist-guided exposure in situ in CBT.“ In: *J. Consult. Clin. Psychol.* 79.3 (2011), S. 406–420.

- [114] D. V. Sheehan u. a. „The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10.“ In: *J. Clin. Psychiatry* 59 Suppl 2 (1998).
- [115] L. G. Hommers u. a. „A functional genetic variation of SLC6A2 repressor hsa-miR-579-3p upregulates sympathetic noradrenergic processes of fear and anxiety“. In: *Transl. Psychiatry* 8.1 (Dez. 2018), S. 226.
- [116] V. Agarwal, G. W. Bell, J.-W. Nam und D. P. Bartel. „Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs“. In: *Elife* 4 (Aug. 2015), S. 1–38.
- [117] I. S. Vlachos u. a. „DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions“. In: *Nucleic Acids Res.* 43.D1 (Jan. 2015), S. D153–D159.
- [118] F. Xiao, Z. Zuo, G. Cai, S. Kang, X. Gao und T. Li. „miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions“. In: *Nucleic Acids Res.* 37.Database (Jan. 2009), S. D105–D110.
- [119] J. Krol, I. Loedige und W. Filipowicz. „The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay“. In: *Nat. Rev. Genet.* 11.9 (Juli 2010), S. 597–610.
- [120] G. Serafini, M. Pompili, M. Innamorati, G. Giordano, F. Montebovi, L. Sher, Y. Dwivedi und P. Girardi. „The role of microRNAs in synaptic plasticity, major affective disorders and suicidal behavior“. In: *Neurosci. Res.* 73.3 (Juli 2012), S. 179–190.
- [121] J. R. Lytle, T. a. Yario und J. a. Steitz. „Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104.23 (Juni 2007), S. 9667–9672.
- [122] A. Brümmer und J. Hausser. „MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: Extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation“. In: *BioEssays* 36.6 (Juni 2014), S. 617–626.
- [123] J. J. Forman und H. a. Collier. „The code within the code: microRNAs target coding regions“. In: *Cell Cycle* 9.8 (Apr. 2010), S. 1533–1541.
- [124] R. Sodoyer. „Expression Systems for the Production of Recombinant Pharmaceuticals“. In: *BioDrugs* 18.1 (2004), S. 51–62.
- [125] G. E. Torres, R. R. Gainetdinov und M. G. Caron. „Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function“. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 4.1 (Jan. 2003), S. 13–25.
- [126] F. Erhard, J. Haas, D. Lieber, G. Malterer, L. Jaskiewicz, M. Zavolan, L. Dolken und R. Zimmer. „Widespread context dependency of microRNA-mediated regulation“. In: *Genome Res.* 24.6 (Juni 2014), S. 906–919.
- [127] H. Siomi und M. C. Siomi. „Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Biogenesis in Animals“. In: *Mol. Cell* 38.3 (Mai 2010), S. 323–332.

- [128] M. Lerner u. a. „MiRNA-27a controls FBW7/hCDC4-dependent cyclin E degradation and cell cycle progression“. In: *Cell Cycle* 10.13 (Juli 2011), S. 2172–2183.
- [129] J.-W. Nam u. a. „Global Analyses of the Effect of Different Cellular Contexts on MicroRNA Targeting“. In: *Mol. Cell* 53.6 (März 2014), S. 1031–1043.
- [130] H. J. Cordell und D. G. Clayton. „Genetic association studies“. In: *Lancet* 366.9491 (Sep. 2005), S. 1121–1131.
- [131] P. M. Abou-Sleiman, M. G. Hanna und N. W. Wood. „Genetic association studies of complex neurological diseases“. In: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 77.12 (Juli 2006), S. 1302–1304.
- [132] O. Issler und A. Chen. „Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders“. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 16.4 (März 2015), S. 201–212.
- [133] B. H. Miller und C. Wahlestedt. „MicroRNA dysregulation in psychiatric disease“. In: *Brain Res.* 1338 (Juni 2010), S. 89–99.
- [134] M. A. Schiele und K. Domschke. „Epigenetics at the crossroads between genes, environment and resilience in anxiety disorders“. In: *Genes, Brain Behav.* (Sep. 2017), S. 1–15.
- [135] K. Chen, F. Song, G. A. Calin, Q. Wei, X. Hao und W. Zhang. „Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology“. In: *Carcinogenesis* 29.7 (Mai 2008), S. 1306–1311.
- [136] M. S. Nicoloso u. a. „Single-Nucleotide Polymorphisms Inside MicroRNA Target Sites Influence Tumor Susceptibility“. In: *Cancer Res.* 70.7 (Apr. 2010), S. 2789–2798.
- [137] A. T. Hattersley und M. I. McCarthy. „What makes a good genetic association study?“ In: *Lancet* 366.9493 (Okt. 2005), S. 1315–1323.
- [138] R. J. McNally. „Anxiety sensitivity and panic disorder“. In: *Biol. Psychiatry* 52.10 (Nov. 2002), S. 938–946.
- [139] N. F. M. Olde Loohuis, A. Kos, G. J. M. Martens, H. Van Bokhoven, N. Nadif Kasri und A. Aschrafi. „MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity“. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 69.1 (Jan. 2012), S. 89–102.
- [140] Y. Dwivedi. „Pathogenetic and therapeutic applications of microRNAs in major depressive disorder“. In: *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* (Feb. 2015).
- [141] E. Maffioletti, A. Cattaneo, G. Rosso, G. Maina, C. Maj, M. Gennarelli, D. Tardito und L. Bocchio-Chiavetto. „Peripheral whole blood microRNA alterations in major depression and bipolar disorder“. In: *J. Affect. Disord.* 200 (Aug. 2016), S. 250–258.
- [142] A. Bhattacharya, J. D. Ziebarth und Y. Cui. „PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways“. In: *Nucleic Acids Res.* 42.D1 (Jan. 2014), S. D86–D91.

- [143] J. Gong, Y. Tong, H.-M. Zhang, K. Wang, T. Hu, G. Shan, J. Sun und A.-Y. Guo. „Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis“. In: *Hum. Mutat.* 33.1 (Jan. 2012), S. 254–263.
- [144] C. Liu, F. Zhang, T. Li, M. Lu, L. Wang, W. Yue und D. Zhang. „MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs“. In: *BMC Genomics* 13.1 (2012), S. 661.
- [145] S. Baskerville und D. P. Bartel. „Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes.“ In: *RNA* 11.3 (März 2005), S. 241–7.
- [146] L. C. Hinske, P. A. F. Galante, E. Limbeck, P. Möhnle, R. B. Parmigiani, L. Ohno-Machado, A. A. Camargo und S. Kreth. „Alternative Polyadenylation Allows Differential Negative Feedback of Human miRNA miR-579 on Its Host Gene ZFR“. In: *PLoS One* 10.3 (März 2015). Hrsg. von D.-Y. Jin, e0121507.
- [147] Z. Zhao, J. He, J. Zhang, M. Liu, S. Yang, N. Li und X. Li. „Dysregulated miR1254 and miR579 for cardiotoxicity in patients treated with bevacizumab in colorectal cancer“. In: *Tumor Biol.* 35.6 (2014), S. 5227–5235.
- [148] M. N. Ziats und O. M. Rennert. „Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain“. In: *Mol. Psychiatry* 19.7 (Juli 2014), S. 848–852.
- [149] K. Domschke u. a. „Chromosome 4q31-34 panic disorder risk locus: Association of neuropeptide Y Y5 receptor variants“. In: *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 147B.4 (Juni 2008), S. 510–516.
- [150] A. S. Howe u. a. „Candidate genes in panic disorder: meta-analyses of 23 common variants in major anxiogenic pathways“. In: *Mol. Psychiatry* August (Sep. 2015), S. 1–15.
- [151] M. Han und Y. Zheng. „Comprehensive Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms in Human MicroRNAs“. In: *PLoS One* 8.11 (Nov. 2013). Hrsg. von H. S. Sun, e78028.
- [152] S. Ripke u. a. „Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci“. In: *Nature* 511.7510 (Juli 2014), S. 421–427.
- [153] R. Chhabra. „miRNA and methylation: a multifaceted liaison.“ In: *Chembiochem* 16.2 (Jan. 2015), S. 195–203.
- [154] A. Abbott. „Psychiatric genetics: The brains of the family“. In: *Nature* 454.7201 (Juli 2008), S. 154–157.
- [155] T. D. Cannon und M. C. Keller. „Endophenotypes in the Genetic Analyses of Mental Disorders“. In: *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2.1 (Apr. 2006), S. 267–290.
- [156] K. Domschke und J. Deckert. „Genetik der Angsterkrankungen“. In: *Nervenarzt* 78.7 (2007), S. 825–835.

- [157] B. J. Casey u. a. „Transitional and translational studies of risk for anxiety“. In: *Depression and Anxiety* 28.1 (2011), S. 18–28.
- [158] E. Neame. „HITS-CLIP hits the microRNA target“. In: *Nat. Rev. Genet.* 10.8 (Aug. 2009), S. 510–511.
- [159] D. W. Thomson, C. P. Bracken und G. J. Goodall. „Experimental strategies for microRNA target identification“. In: *Nucleic Acids Res.* 39.16 (Sep. 2011), S. 6845–6853.
- [160] M.-L. Si, S. Zhu, H. Wu, Z. Lu, F. Wu und Y.-Y. Mo. „miR-21-mediated tumor growth“. In: *Oncogene* 26.19 (Apr. 2007), S. 2799–2803.
- [161] R. Rupaimoole und F. J. Slack. „MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases“. In: *Nat. Rev. Drug Discov.* 16.3 (Feb. 2017), S. 203–222.
- [162] J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan und M. Stoffel. „Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'“. In: *Nature* (Dez. 2005).
- [163] K. A. Scott, A. E. Hoban, G. Clarke, G. M. Moloney, T. G. Dinan und J. F. Cryan. „Thinking small: towards microRNA-based therapeutics for anxiety disorders“. In: *Expert Opin. Investig. Drugs* 24.4 (Apr. 2015), S. 529–542.
- [164] R. M. O'Connor, T. G. Dinan und J. F. Cryan. „Little things on which happiness depends: microRNAs as novel therapeutic targets for the treatment of anxiety and depression“. In: *Mol. Psychiatry* 17.4 (Apr. 2012), S. 359–376.

7 Anhang

Human microRNA Disease Database <http://www.cuilab.cn/hmdd>

miRBase <http://mirbase.org>

TargetScan <http://www.targetscan.org>

DIANA microT-CDS http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index

DIANA-TarBase <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index>

miRDB <http://mirdb.org/>

PolymiRTS Database <http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/home.php>

miRecords <http://c1.accurascience.com/miRecords>

PolymiRTS Database 3.0 <http://compbio.uthsc.edu/miRSNP>

miRNASNP 2.0 <http://bioguo.org/miRNASNP2/>

miRSNP Search <http://bioinfo.bjmu.edu.cn/mirsnp/search/>

LD TAG SNP Selection <https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snptag.html>

Danksagung

Bei allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Professor Dr. Jürgen Deckert, für die Möglichkeit, diese Dissertation zu erstellen, für die Übernahme des Erstreferats und für die hilfreiche und konstruktive Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. Leif Hommers für die intensive, professionelle und gewissenhafte Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit. Seine zahlreichen fachlichen Anregungen und konstruktiven Lösungsvorschläge, Geduld und stets offenes Ohr trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Frau Professor Dr. Antje Gohla danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Mein innigster Dank gilt auch meiner Partnerin Juliane, sowie meinen Eltern und Geschwistern, die mich in jeder Phase dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, besonders Frau B. Thur sowie Frau A. Pohl, für ihre freundliche Hilfe und Unterstützung bei den Arbeiten im Labor danken.