

Abstract

Host defense against pathogens is essential for living organisms to ensure cellular homeostasis and survival. Mounting a proper immune response to eliminate invaders is just as important as dampening the inflammatory response to prevent tissue damage. Multiple cellular mechanisms, including transcriptional regulation, exist to maintain this balance. In recent years, a class of small RNAs, namely miRNAs, was shown to significantly regulate the immune response to diverse inflammatory stimuli on post-transcriptional level. To regulate their respective targets, miRNAs need to be anchored to the RISC, which harbors Ago2 as one essential component. For this thesis, we generated a novel KI mouse line, which expresses an epitope-tagged (FLAG-HA) construct of Ago2, in order to identify Ago2-associated, functional small RNAs upon host-pathogen interactions, by HITS-CLIP. We first analysed FLAG-HA-Ago2 expression in PECs and organs of KI mice and efficiently immunoprecipitated Ago2 using FLAG or HA antibodies. To perform HITS-CLIP, we isolated splenocytes from *Listeria* infected KI mice, and combined UV-crosslinking with HA-IP. We then generated libraries of immunoprecipitated splenic small RNAs, followed by PAGE-based clean-up. NGS of our libraries revealed for the first time an unbiased profile of *in vivo* *Listeria*-induced, Ago2-associated splenic miRNAs, mRNAs and lncRNAs. Additionally, we screened our results for potential miRNA-target pairs and demonstrated regulation of miR-26a and Hp1bp3 upon *Listeria* and *S. aureus* infection in BMDMs *in vitro*. In parallel, we studied the regulation and function of miR-125a-3p and miR-155, shown to be induced by *Listeria*, *in vitro* in BMDMs. Although, using gain-of-function studies, we could show that induction of miR-125a-3p was not only restricted to *Listeria* infection, but also occurred upon infection with *Mycobacterium* and stimulation with poly(I:C), we could not find a property for this miRNA in this context. However, we could show that AntagomiR-mediated inhibition of miR-155 likely prevents phagocytosis of *Listeria*, although the exact mechanism is still unclear. Finally, we studied the role of canonical miRNAs in the anti-bacterial immune response *in vivo*. For this purpose, we ablated DGCR8, which is required for the processing of primary miRNA transcripts, in IFN-responsive cells, using Mx1-Cre mice. We then showed an impaired bacterial clearance in spleens and livers and increased serum cytokine production in DGCR8 KO mice upon *Listeria* infection, compared to WT mice, emphasizing the implication of miRNA-mediated control of host-pathogen interactions.

In summary, this PhD thesis contributes novel *in vivo* tools and *in vitro* methods for in-depth analyses of small RNA-protein interactions and the results shed further

light on the miRNA-mediated mechanisms that regulate host-pathogen interactions in hematopoietic cells.

Kurzzusammenfassung

Die Wirtsabwehr gegen Pathogene ist essentiell für lebende Organismen, um zelluläre Homöostase und das Überleben zu sichern. Die Generierung einer angemessenen Immunantwort, um Eindringlinge zu eliminieren ist genauso wichtig, wie die Dämpfung der Entzündungsreaktion um Gewebsschäden zu verhindern. Mehrfache zelluläre Mechanismen um diese Balance aufrecht zu erhalten, inklusive die Regulation der Transkription, existieren. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass eine Klasse von kleinen RNAs, nämlich miRNAs, die Immunantwort auf verschiedene entzündliche Stimuli auf post-transkriptionaler Ebene erheblich reguliert. Um ihre entsprechenden Zielgene zu regulieren müssen miRNAs im RISC, welcher Ago2 als einen essentiellen Bestandteil beherbergt, verankert sein. Um Ago2-assoziierte, funktionale kleine RNAs nach Wirt-Pathogen-Interaktion mittels HITS-CLIP zu identifizieren, haben wir für diese Arbeit eine neue KI Mauslinie generiert, welche ein Epitop (FLAG, HA)-markiertes Konstrukt von Ago2 exprimiert. Zuerst analysierten wir die Expression von FLAG-HA-Ago2 in PECs und Organen von KI Mäusen und immunpräzipitierten Ago2 erfolgreich mit Hilfe von FLAG- oder HA-Antikörpern. Um HITS-CLIP durchzuführen, isolierten wir Milzzellen von *Listeria*-infizierten KI Mäusen und kombinierten UV-Quervernetzung mit HA-IP. Dann stellten wir Bibliotheken von immunpräzipitierten, kleinen RNAs der Milz her, gefolgt von Aufreinigung mittels PAGE. NGS unserer Bibliotheken enthüllte zum ersten Mal ein unvoreingenommenes Profil von *in vivo* *Listeria*-induzierten Ago2-assoziierten miRNAs, mRNAs und lncRNAs der Milz. Zusätzlich durchsuchten wir unsere Ergebnisse nach potentiellen miRNA-Zielgen Paaren und zeigten Regulation von miR-26a and Hp1bp3 bei *in vitro* Infektion von BMDMs mit *Listeria* und *S. aureus*. Parallel dazu studierten wir die Regulation und Funktion von miR-125a-3p und miR-155, für welche gezeigt wurde, dass sie in BMDMs *in vitro* durch *Listeria* induziert werden. Obwohl wir mittels Gain-of-Function-Studien zeigen konnten, dass Induktion von miR-125a-3p nicht nur auf Infektion mit *Listeria* begrenzt ist, sondern auch nach Infektion mit *Mycobacterium* und Stimulation mit poly(I:C) auftritt, konnten wir keine Eigenschaft für diese miRNA in diesem Kontext finden. Wir konnten jedoch zeigen, dass AntagomiR-herbeigeführte Inhibition von miR-155 wahrscheinlich Phagozytose von *Listeria* verhindert, obwohl der genaue Mechanismus noch unklar ist. Abschließend haben wir die Rolle von kanonischen miRNAs in der anti-bakteriellen Immunantwort *in vivo* studiert. Zu diesem Zweck haben wir DGCR8, welches für die Prozessierung von primären miRNA Transkripten benötigt wird, in IFN-aktivierbaren Zellen mithilfe von Mx1-Cre Mäusen deletiert. Wir zeigten dann eine eingeschränkte Beseitigung von Bakterien in Milz und Leber und eine erhöhte Zytokin-Produktion im Serum von DGCR8 KO Mäusen nach Infektion mit *Listeria*, verglichen mit WT Mäusen; welches die Verwicklung der miRNA-vermittelten Kontrolle in der Wirt-Pathogen-Interaktion hervorhebt.

Zusammenfassend trägt diese Doktorarbeit neue *in vivo* Werkzeuge und *in vitro* Methoden für detaillierte Analysen von kleinen RNA-Protein Interaktionen bei und die Ergebnisse geben weiteren Aufschluss über miRNA-vermittelte Mechanismen, welche Wirt-Pathogen-Interaktionen in hematopoietischen Zellen regulieren.