

Aus dem Institut für Pathologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Alfred C. Feller  
vertreten in der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
durch das Institut für Virologie und Zellbiologie  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Tautz  
der Universität zu Lübeck

**Charakterisierung von  
diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen  
und folliculären Lymphomen  
durch microRNA-Expressionsprofile,  
sowie funktionelle Analysen der microRNA-205**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -**

Vorgelegt von  
**Anja Röhle**  
aus Bad Frankenhausen

Lübeck  
November 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Tautz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Merz

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.2009

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 23.02.2009

gez. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Prestin

– Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät –

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Hoefig, K.P., Thorns, C., Roehle, A., Kaehler, C., Wesche, K.O., Repsilber, D., Branke, B., Thiere, M., Feller, A.C., Merz, H. (2008) Unlocking pathology archives for microRNA-profiling. **Anticancer Res. 28(1A): 119-123.**

Roehle, A., Hoefig, K.P., Repsilber, D., Thorns, C., Ziepert, M., Wesche, K.O., Thiere, M., Loeffler, M., Klapper, W., Pfreundschuh, M., Matolcsy, A., Bernd, H.-W., Merz, H., Feller, A.C. (2008) MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas. **Br J Haematol 142(5): 732-744.**

Roehle, A., Stellmacher, F., Jarutat, T., Merz, H., Feller, A.C. Epithelium-specific microRNA-205 regulates ARTS/Sept4 expression and cell proliferation. **Manuskript in Vorbereitung**

*Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens  
sorgt unablässig dafür,  
dass dem forschenden Menscheng Geist  
seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben  
und immer wieder von neuem angefacht werden:  
Die Begeisterung und die Ehrfurcht.*

Max Planck (1858-1947)

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
2.1 GENREGULATION UND ENTWICKLUNG BEI EUKARYOTEN.....	3
2.2 POSTTRANSKRIPTIONELLE GENREGULATION DURCH KLEINE RNAS.....	4
2.2.1 <i>MicroRNAs</i> .....	4
2.2.1.1 Allgemeine Informationen .....	4
2.2.1.2 Die Entdeckung der miRNAs.....	5
2.2.1.3 miRNA Gene und deren Expressionsmuster.....	6
2.2.2 <i>Biogenese von miRNAs</i> .....	7
2.2.2.1 miRNA Transkription.....	8
2.2.2.2 miRNA Reifung .....	9
2.2.2.3 miRNA Inkorporation in den miRISC .....	11
2.2.3 <i>Mechanismen der miRNA-Funktion</i> .....	12
2.2.3.1 Translationelle Repression oder mRNA-Spaltung durch miRNA.....	12
2.2.3.2 Prinzipien der miRNA Zielerkennung.....	14
2.2.3.3 Computergestützte Vorhersage von Ziel-mRNAs .....	15
2.2.4 <i>Funktionelle Charakterisierung von miRNAs</i> .....	16
2.2.5 <i>Diagnose, Prognose und Behandlungskontrolle durch miRNAs</i> .....	18
2.3 LYMPHOME.....	19
2.3.1 <i>Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome</i> .....	19
2.3.2 <i>Follikuläre Lymphome</i> .....	20
2.4 ZIELE DIESER ARBEIT .....	22
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
3.1 MATERIAL .....	23
3.1.1 <i>Organismen</i> .....	23
3.1.1.1 Zelllinien.....	23
3.1.1.2 Stämme von Escherichia coli (E. coli).....	23
3.1.2 <i>Patientenmaterial</i> .....	23
3.1.3 <i>Antikörper</i> .....	24
3.1.4 <i>Vektoren</i> .....	24
3.1.5 <i>Oligonukleotide</i> .....	24
3.1.6 <i>Puffer, Lösungen und Medien</i> .....	26
3.1.7 <i>Nährmedien</i> .....	27
3.1.8 <i>Enzyme, Chemikalien, Geräte und Sonstiges</i> .....	27
3.1.8.1 Chemikalien .....	27

3.1.8.2	Reagenzien.....	28
3.1.8.3	Enzyme, DNA-Längenmarker und RNase-Inhibitoren .....	28
3.1.8.4	Kits.....	29
3.1.8.5	Geräte.....	29
3.1.8.6	Verbrauchsmaterialien.....	31
3.1.8.7	In silico Ressourcen .....	32
3.1.8.8	Dienstleistungen.....	32
3.2	METHODEN .....	33
3.2.1	<i>Zellkultur</i> .....	33
3.2.1.1	Kultivierung permanenter Zelllinien .....	33
3.2.1.2	Aufbewahrung von Zelllinien .....	33
3.2.1.3	Zellzahlbestimmung.....	33
3.2.1.4	Transfektion .....	33
3.2.1.5	MTT-Assay .....	34
3.2.1.6	Dual-Luciferase-Reporter-Assay .....	34
3.2.2	<i>Bakterienkultur</i> .....	35
3.2.2.1	Kultivierung und Aufbewahrung.....	35
3.2.2.2	Transformation.....	35
3.2.3	<i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	35
3.2.3.1	Handhabung von Nukleinsäuren.....	35
3.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	36
3.2.3.3	Isolierung von Nukleinsäuren .....	36
3.2.3.3.1	Isolierung von chromosomaler DNA.....	36
3.2.3.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA .....	36
3.2.3.3.3	Isolierung von RNA .....	37
3.2.3.3.4	Isolierung von miRNA .....	37
3.2.3.4	Restriktionsverdau von DNA.....	37
3.2.3.5	Dephosphorylierung von DNA .....	38
3.2.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase.....	38
3.2.3.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
3.2.3.8	Elution von DNA aus Agarosegelen.....	38
3.2.3.9	Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	39
3.2.3.9.1	Reverse Transkription von mRNA .....	39
3.2.3.9.2	Reverse Transkription von miRNA .....	39
3.2.3.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
3.2.3.10.1	Amplifikation von DNA und cDNA.....	40
3.2.3.10.2	Quantitative RT-PCR von mRNA und miRNA .....	41
3.2.4	<i>Proteinbiochemische Methoden</i> .....	45
3.2.4.1	Proteinextraktion aus Zellkulturzellen .....	45
3.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Test) .....	45
3.2.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen und Coomassie-Färbung.....	45
3.2.4.4	Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot) und Immundetektion.....	46
3.2.4.5	Immunblot-Stripping.....	46

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
4.1	MiRNA-EXPRESSIONSPROFILE VON DLBCLS UND FLs	47
4.1.1	Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von DLBCLs und Normalgewebe	48
4.1.2	Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von FLs und Normalgewebe	49
4.1.3	Vergleich von miRNA-Signaturen der beiden Lymphomentitäten DLBCLs und FLs	50
4.1.4	MiRNAs mit einem Einfluss auf die Entwicklung von Lymphomen	51
4.1.5	Vergleich der miRNA-Expressionssignaturen von GCB- und non-GCB-Untergruppen innerhalb der DLBCLs	52
4.1.6	MiRNAs mit diagnostischer Relevanz für DLBCLs und FLs	53
4.1.7	MiRNAs mit prognostischer Relevanz bei DLBCLs	55
4.2	FUNKTIONELLE ANALYSEN DER MiRNA-205	58
4.2.1	Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von Lymphknoten und Tonsillen	59
4.2.2	Expressionsmuster von miRNA-205 in diversen Geweben und Organen	61
4.2.3	Lokalisation der miRNA-205 Expression in Geweben mit hohen Expressionsleveln	63
4.2.4	Nachweis der miRNA-205-Expression in Karzinomen	66
4.2.5	Nachweis von miRNA-205 Expression in diversen Zelllinien	69
4.2.6	Detektionslimit von miRNA-205 (Verdünnungsreihen)	70
4.2.7	Nachweis von miRNA-205 Expression in Sentinellymphknoten	71
4.2.8	Optimierung der einzusetzenden miRNA-205 Konzentrationen in Transfektionsexperimenten	74
4.2.8.1	Transfektionsoptimierung für HEK-293 Zellen	75
4.2.8.2	Transfektionsoptimierung für Karzinomzelllinien	76
4.2.9	Regulation von miRNA-Expressionsleveln durch differentielle miRNA-205-Expression (miRNA-regulierte miRNA-Expression)	78
4.2.9.1	Änderungen von miRNA-Expressionsleveln nach miRNA-205 Transfektion	78
4.2.9.2	Analysen von miRNA-184 und miRNA-203	79
4.2.10	Computergestützte Zielgenanalyse von miRNA-205	82
4.2.10.1	Putative Zielgene von miRNA-205 mit regulatorischen Funktionen während des Zellzyklus	83
4.2.10.2	Weitere putative Zielgene mit und ohne direkte miR-205 Regulation	84
4.2.11	Einfluss der miRNA-205 auf die Zahl lebender Zellen	85
4.2.11.1	Untersuchung von HEK-293 Zellen	86
4.2.11.2	Untersuchung von T24 Zellen	87
4.2.11.3	Untersuchung von KU-19-19 Zellen	88
4.2.11.4	Untersuchung von TCC-SUP Zellen	90
4.2.12	Einfluss der miRNA-205 auf das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen	91
4.2.13	Einfluss der miRNA-205 auf das mRNA-Expressionslevel	92
4.2.13.1	Erzeugung von Standardkurven für die zu untersuchenden mutmaßlichen Ziel-mRNAs	93
4.2.13.2	Relative Quantifizierungen der putativen Ziel-mRNAs	94
4.2.14	Einfluss der miRNA-205 auf das Proteinlevel	96
4.2.14.1	Etablierung von Nachweismethoden zur Detektion der mutmaßlichen Ziel-Proteine	97
4.2.14.1.1	Etablierung des ARTS-Antikörpers	97
4.2.14.1.2	Etablierung des INPPL1-Antikörpers	98

4.2.14.1.3	Etablierung des PHB-Antikörpers .....	98
4.2.14.1.4	Etablierung des PKCB-Antikörpers .....	99
4.2.14.2	Nachweis einer regulatorischen Wirkung von miRNA-205 auf die Proteinmenge mutmaßlicher Zielgene .....	100
4.2.14.2.1	Nachweis eines Effekts auf INPPL1 .....	100
4.2.14.2.2	Nachweis eines Effekts auf ARTS .....	101
4.2.14.2.3	Nachweis eines Effekts auf PHB .....	102
4.2.14.2.4	Nachweis eines Effekts auf PKCB .....	103
4.2.15	<i>Nachweis der direkten Regulation von Zielgenen durch die miRNA-205</i> .....	104
4.2.15.1	Erzeugung von Testvektoren .....	105
4.2.15.2	Messungen der Luciferaseexpressionen .....	105
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>108</b>
5.1	MIRNA-EXPRESSIONSPROFILE VON DLBCL UND FL .....	108
5.1.1	<i>MiRNA-Expressionsprofile unterscheiden zwischen DLBCL, FL und Normalgewebe</i> .....	108
5.1.2	<i>MiRNA-Expressionsprofile können nicht für die Unterscheidung von GCB- und non-GCB-DLBCL genutzt werden</i> .....	109
5.1.3	<i>Einige miRNAs besitzen eine prognostische Aussagekraft bei Patienten mit Diagnose DLBCL</i> .....	110
5.2	FUNKTIONELLE ANALYSEN DER MIRNA-205 .....	111
5.2.1	<i>MiRNA-205 wird hauptsächlich in Epithelzellen exprimiert</i> .....	111
5.2.2	<i>MiRNA-205 wird sehr stark in den meisten Karzinomzellen exprimiert</i> .....	113
5.2.3	<i>Die miRNA-205 Expression hat eine regulatorische Wirkung auf die Expression von miR-203 und miR-184</i> .....	114
5.2.4	<i>Die Überexpression von miRNA-205 führt zur Inhibition des Zellzyklus</i> .....	116
5.2.5	<i>Die Regulation von ARTS und INPPL1 erfolgt direkt durch miRNA-205</i> .....	117
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>136</b>
7.1	TABELLARISCHE AUFLISTUNG DER ERGEBNISSE .....	136
7.1.1	<i>Nachweis der miRNA-205 Expression</i> .....	136
7.1.1.1	MiRNA-205 Expression in Tonsillen und Lymphknoten .....	136
7.1.1.2	MiRNA-205 Expression in Organen und Geweben .....	137
7.1.1.3	MiRNA-205 Expression in mikrodisektierten Organen .....	138
7.1.1.4	MiRNA-205 Expression in Karzinomen .....	138
7.1.1.5	MiRNA-205 Expression in Zelllinien .....	139
7.1.1.6	MiRNA-205 Expression in Verdünnungsreihen .....	140
7.1.1.7	MiRNA-205 Expression in Sentinellymphknoten .....	140
7.1.2	<i>Transfektionsoptimierung</i> .....	140
7.1.3	<i>MiRNA-regulierte miRNA-Expression</i> .....	141
7.1.4	<i>MTT-Assay</i> .....	141
7.1.5	<i>Quantitative RT-PCRs der mRNA-Expressionen von putativen Zielgenen</i> .....	143
7.1.6	<i>Luciferase-Assay</i> .....	143

7.2	SEQUENZEN DER 3'UTRS VON ARTS UND INPPL1 .....	145
7.3	DANKSAGUNG .....	146
7.4	LEBENS LAUF .....	148
7.5	ERKLÄRUNG.....	149

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
A	Ampere
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Zenti-
ca.	circa
cDNA	<i>copy</i> DNA
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminessäure
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbant assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
k	Kilo-
l	Liter

LB	Luria Broth
m	Milli-, Meter
M	Molar
MEM	Modified Eagle Medium
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Nano-
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
Oligo d(T)	Oligodeoxythymidin
p	Piko-
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
rpm	<i>round per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
SOC	<i>Super Optimal Catabolite repression</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan

tRNA	Transfer-RNA
U	(Enzym-)Einheit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
vs	versus
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

## 1 Zusammenfassung

Bei microRNAs (miRNAs) handelt es sich um kleine, nicht-codierende RNAs mit einer Länge von 19-24 nt. Sie stellen eine Klasse von negativen Genregulatoren dar, die alle wichtigen biologischen Prozesse der Zelle, wie z.B. Apoptose, Differenzierung und Entwicklung, steuern. Dies geschieht durch die sequenzspezifische Bindung der miRNA an die 3'UTR des Zielgens, was zur Inhibition der Translation oder zum Abbau der mRNA führt. MiRNAs sind in einer Vielzahl von Metazoen, Pflanzen und Viren verbreitet und werden dort zell- und/oder zeitgesteuert exprimiert. Diverse Arbeiten beschreiben die zentrale Rolle der miRNAs während der Bildung und Progression von humanen Malignomen. Patientenstudien zeigen zudem, dass miRNA-Profilung das Potential zur Tumorklassifikation und Vorhersage des Krankheitsverlaufes hat. Funktionelle Studien, auch in Tiermodellen, deuten darauf hin, dass miRNAs sowohl als Onkogene als auch Tumorsuppressoren agieren können.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Expressionssignaturen von 157 miRNAs bei 58 diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCLs), 46 Follikulären Lymphomen (FLs) und sieben nicht-neoplastischen Lymphknoten analysiert. Der Vergleich erbrachte spezifische DLBCL- und FL-Signaturen, zu denen miRNAs mit bereits bekannten Funktionen in hämatopoetischen Zellen (miR-150 und miR-155) oder der Tumorentwicklung (miR-210, miR-10a, miR-17-5p und miR-145) gehören. Im Vergleich zu den Lymphknoten wurden einige miRNAs identifiziert, die in beiden Lymphomentitäten dysreguliert sind (miR-155, miR-210, miR-106a, miR-149 und miR-139). Dagegen zeigten andere miRNAs eine lymphomspezifische Expression (z.B. miR-9/9\*, miR-301, miR-338 und miR-213 für FLs; miR-150, miR-17-5p, miR-145, miR-328 und andere für DLBCLs). Es konnte ein Klassifikationsbaum erzeugt werden, der mit vier miRNAs (miR-330, miR-17-5p, miR-106a und miR-210) 109 der 111 (98%) untersuchten Fälle korrekt zuordnete. Zudem konnten acht miRNAs identifiziert werden, die mit dem ereignisfreien und/oder dem Gesamtüberleben von Patienten mit der Diagnose DLBCL korrelierten. Zu diesen gehören bekannte Tumorsuppressoren (miR-21, miR-127 und miR-34a) und Onkogene (miR-195 und let-7g).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Verteilung der miR-205 Expression in diversen Organen und Geweben untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese spezifisch in Epithelzellen exprimiert wird, wobei dieses Muster offenbar auch im Rahmen einer malignen Transformation beibehalten wird. In funktionellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die miR-205 für die Initiation und Aufrechterhaltung der epithelialen Differenzierung der Zelle verantwortlich ist.

Dies geschieht primär durch die reversible Inhibition der Zellproliferation, was unter anderem durch die direkte Steuerung der Expressionen von ARTS und INPPL1 erfolgt. Bei beiden Genen handelt es sich um bereits bekannte Regulatoren des Zellzyklus. Die miR-205 Expression ist zudem mit der von miR-203 und miR-184 korreliert und kann deren Expression in der Zelle beeinflussen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Genregulation und Entwicklung bei Eukaryoten

Wachstum und Entwicklung von mehrzelligen Organismen sind durch die Spezifikation und Differenzierung von diversen Zelltypen und Organen charakterisiert. Eine Vielzahl von Proteinen und anderen Molekülen regulieren diese Prozesse durch ihr örtliches und zeitlich abgestimmtes Auftreten in adäquaten Konzentrationen. Aus diesem Grund muss die Menge an Proteinen stets sehr genau koordiniert werden.

Die Information zur Synthese der Proteine ist in der Basensequenz der DNA gespeichert. Die Bildung anderer Moleküle wird in der Regel durch Proteine katalysiert, so dass die Proteinbildung und –stabilität wichtige Faktoren in der Regulation von Differenzierungsprozessen sind. Die Erzeugung von Proteinen verläuft in zwei Stufen, die bei Eukaryoten nicht nur zeitlich, sondern auch räumlich voneinander getrennt sind. Die Transkription der genetischen Informationen im Kern ist eine, von der DNA als Matrize abhängige, RNA-Synthese. Die anschließende Translation dieser mRNA in eine Proteinsequenz erfolgt nach dem Export der RNA in das Cytoplasma. Auf allen Ebenen dieses Prozesses kann regulatorisch eingegriffen werden: bei der Transkriptionsrate (Transkriptionsregulation), der Transkriptstabilität (posttranskriptionelle Regulation), der Translationseffizienz (Translationsregulation) und der Proteinstabilität (posttranslationelle Regulation) <sup>1-4</sup>.

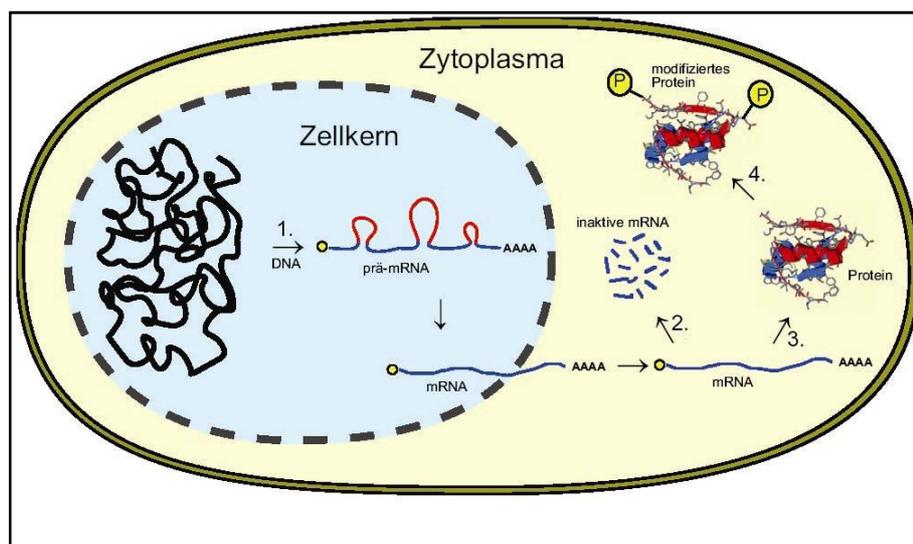


Abb. 1: Schematische Darstellung der Genexpression. Die Zahlen zeigen die Hauptklassen der Regulation an: 1) Regulation der Transkription, 2) posttranskriptionelle Regulation, 3) Regulation der Translation und 4) posttranslationelle Regulation (Abbildung aus <sup>1</sup> entnommen und modifiziert).

## 2.2 Posttranskriptionelle Genregulation durch kleine RNAs

### 2.2.1 MicroRNAs

#### 2.2.1.1 Allgemeine Informationen

In den letzten Jahren gab es eine bemerkenswerte Erweiterung des Wissens über die Funktionen von RNAs jenseits der traditionellen ribosomalen RNA, Transfer-RNA und Boten-RNA. Die RNA-vermittelte Genregulation umfasst eine Vielzahl von Mechanismen, so zum Beispiel RNA-Editing, differentielles Splicen, RNAi, Heterochromatinbildung, genetische Rekombination und translationelle Kontrolle durch autoregulatorische mRNAs und miRNAs. Zellen besitzen eine Vielzahl von nicht-codierenden RNAs. Dazu gehören auch Teile der Genexpressionsmaschinerie, wie tRNAs, rRNAs und regulatorische RNAs, die die Expression anderer RNAs beeinflussen. Zu diesen RNAs zählen die siRNAs (*short interfering RNAs*), miRNAs, kleine nukleäre RNAs (snRNAs, *small nuclear RNAs*) und kleine modulierende RNAs (smRNAs, *small modulating RNAs*)<sup>7,8</sup>. Nicht-codierende RNAs sind erstaunlich divers und verbreitet in der Zelle. So haben genomische Tiling-Arrays gezeigt, dass die Hälfte aller Transkripte nicht-codierend sind<sup>9</sup>. Eine große Klasse von nicht-codierenden RNAs – die miRNAs – wurden erstmals 2001 beschrieben<sup>10-12</sup>. MiRNA-Gene produzieren Transkripte, die nach posttranskriptioneller Prozessierung als 22-25 nt kleine Antisense-Inhibitoren der mRNA-Translation agieren. Als solche, können miRNAs als ein genetischer Filter angesehen werden, der die Menge an Transkripten einer Zelle registriert und bestimmt, welche mRNAs in Proteine translatiert werden. Tausende miRNAs wurden in Würmern, Fliegen, Pflanzen, Säugern und Viren identifiziert. Davon sind viele evolutionär konserviert<sup>13</sup>. Mit mehr als 200 Mitgliedern pro Spezies in höheren Eukaryoten sind die miRNAs eine der größten Genfamilien und machen ~1% des Genoms aus<sup>14</sup>. Studien ergaben, dass miRNAs die Expression von mehr als 30% der protein-codierenden Gene im Menschen und anderen Organismen regulieren<sup>15,16</sup>. Funktionelle Analysen einzelner miRNAs haben gerade erst begonnen. Die vorhandenen Studien zeigen aber bereits, dass miRNAs Schlüsselrollen in vielen regulatorischen Prozessen wie der Kontrolle von Entwicklungszeiten, hämatopoetischer Zelldifferenzierung, Apoptose, Zellproliferation und Organentwicklung haben (Zusammenfassung in<sup>14,17</sup>).

### 2.2.1.2 Die Entdeckung der miRNAs

Die erste beschriebene miRNA, *lin-4*, wurde in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) durch einen genetischen Screen auf Defekte in der zeitlichen Kontrolle der post-embryonalen Entwicklung entdeckt<sup>18,19</sup>. *C. elegans* hat vier larvale Stadien (L1-L4) mit distinkten und charakteristischen Zelllinien. Mutationen in *lin-4* unterbrechen die Regulation der larvalen Entwicklung. Dies führt zu einer zeitlichen Fehlregulation der Zellmuster. Falsche Entwicklungsphänotypen – die Auslassung der L1 Zellpfade und der vorzeitige Eintritt in das L2-Stadium – wurden in Würmern gefunden, die *lin-14* defizient waren<sup>20</sup>. *Lin-14* codiert für ein nukleäres Protein, dessen Herabregulation am Ende des L1-Stadiums den Übergang in das L2-Stadium initiiert<sup>21,22</sup>. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass das *lin-4* Gen eine nicht-codierende RNA erzeugt. Lee *et al.* identifizierten zwei Produkte von *lin-4*: ein ~70 nt Transkript mit einer *stem-loop*-Struktur und eine 22 nt RNA, die von dieser Stammsequenz abstammt<sup>21</sup>. Die Autoren schlossen daraus, dass die 70 nt Form einen Vorläufer darstellt und dass die 22 nt RNA durch nukleolytische Prozesse daraus hervorgeht. Weiterhin beschrieben sie, dass die 22 nt *lin-4* RNA eine Antisense-Komplementarität zu verschiedenen Stellen in der 3'-untranslatierten Region (UTR) des *lin-14* Gens hat<sup>21,23</sup>. Diese Beobachtungen führten zu einem Modell für die Regulation der Entwicklung von *lin-14* durch *lin-4*, in dem *lin-4* die LIN-14 Proteinexpression, durch die Bindung an die 3'UTR der *lin-14* mRNA, negativ reguliert<sup>24-26</sup>. Durch diese negative Regulation kontrolliert *lin-4* den Zellpfad-Übergang der frühen Stadien der larvalen Entwicklung (L1/L2).

Die Entdeckung von *lin-4* und seiner Funktion in der zielspezifischen Hemmung der Translation eröffnete einen neuen posttranskriptionellen Mechanismus der Genregulation während der Entwicklung. Im Jahr 2000 wurde die zweite *C. elegans* miRNA, *let-7*, entdeckt. Wie *lin-4*, zeigten auch *let-7* Mutanten Störungen in der zeitlichen Abstimmung von Entwicklungsereignissen<sup>27</sup>. *Let-7* codiert eine 21 nt RNA, die den Übergang von den vier larvalen Stadien in das Adultstadium kontrolliert. *Let-7* bindet an die 3'UTRs von *lin-41* und des *hunchback-like* Gens (*hbl-1*) und inhibiert deren Translation<sup>27-31</sup>. Wie *lin-4* wird auch *let-7* von einem charakteristischen ~70 nt RNA-Vorläufer produziert<sup>32</sup>. *Let-7* ist phylogenetisch konserviert. Homologe des *let-7* Gens findet man auch im Genom von Menschen, Mäusen, Ratten, Hühnern, Mollusken und Fliegen. Die Expression der reifen *let-7* erfolgt zeitlich gesteuert während der *C. elegans* Entwicklung. Auch dabei handelt es sich um ein konserviertes Phänomen durch die Stämme hinweg<sup>32</sup>. Zudem ist die Sequenz des *let-7* Zielgens *lin-41* ebenfalls in Zebrafisch, Fruchtfliege und Maus konserviert<sup>30</sup>. Die 3'UTR der *lin-41* Homologe tragen *let-*

7 komplementäre Stellen<sup>32</sup>. Sowohl die Konservierung von *let-7* und *lin-41* Sequenzen als auch die temporären Expressionsmuster während der Entwicklung legen nahe, dass dieser neue posttranskriptionelle Regulationsmechanismus evolutionär sehr ursprünglich ist.

### 2.2.1.3 miRNA Gene und deren Expressionsmuster

Die Erkenntnis, dass *C. elegans* miRNA-Gene evolutionär konserviert sind, veranlasste mehrere Labore dazu, kleine RNA-Moleküle aus *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), Maus und menschlichen Zelllinien zu klonieren und sequenzieren. Anfangs wurden hunderte von ~22meren identifiziert. Darunter befanden sich 20 neue Gene in *D. melanogaster*, 30 im Menschen und 60 in *C. elegans*. Alle diese neuen Transkripte erfüllten die folgenden Kriterien: sie waren ~22 nt endogen exprimierte RNAs, stammten laut Vorhersage (durch das MFOLD Programm<sup>33</sup>) von einem ~70 nt langen Vorläufer ab und waren in den verschiedenen Stämmen stark konserviert<sup>10-12</sup>. Diese neue Klasse von kleinen RNAs wurde microRNAs/miRNAs genannt. Viele, aber nicht alle, der neu identifizierten miRNAs hatten regulierte Expressionsmuster während der Entwicklung, wie z.B. Zell- und Gewebespezifität. Zudem wurde angenommen, dass miRNAs nicht nur während der zeitlichen Steuerung der Entwicklung von Bedeutung sind. Neben der Klonierungsstrategie, wurden viele miRNA-Gene auch durch bioinformatische Suche in verschiedenen Spezies (Maus, Ratte, Mensch, Zebrafisch, Wurm, Fliege, Pflanzen) gefunden. Zusammen führte das zu der derzeitigen Abschätzung von über 800 miRNA-Genen im menschlichen Genom<sup>34-43</sup>. Griffiths-Jones *et al.* haben eine Online-Datenbank (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/>) etabliert, um die miRNAs zu sortieren und die Nomenklatur neuer miRNA Gene zu erleichtern<sup>44</sup>. Mit etwa 75% liegen die meisten miRNA-Gene in intergenischen Regionen und bilden eigenständige Transkriptionseinheiten<sup>94</sup>. Etwa 25% sind jedoch in Introns von Genen lokalisiert, so dass sie mit diesen Genen koexprimiert werden. Sie liegen meistens, wie in Eukaryoten üblich, als monocistronische Gene vor. Darüber hinaus existieren aber auch Gen-Cluster mit polycistronischen Primärtranskripten<sup>11,12</sup>.

Diverse Methoden wie Northern Blot, Microarrays und in-situ Hybridisierungen wurden genutzt, um miRNA-Expressionsstudien in verschiedenen Organismen zu untersuchen (Zusammenfassungen in<sup>8,14,46,47</sup>). MiRNAs zeigten dabei eine große Vielfalt an Expressionsmustern. Die Expression mancher miRNAs ist während der Entwicklung reguliert, andere werden dagegen konstitutiv exprimiert. Viele miRNAs haben eine zell- und gewebespezifische Expres-

sion, andere werden ubiquitär exprimiert. Die Vielzahl von miRNA-Expressionsmustern zeigen, dass miRNAs ein großes Spektrum von regulatorischen Aktivitäten in Tieren haben. Sie spielen eine evolutionär konservierte Rolle in der Entwicklung und der Physiologie. Zudem führte die Erkenntnis, dass die miRNA-Expression während der Tumorgenese dysreguliert ist, zu der Annahme, dass miRNAs an der Krebsentstehung beteiligt sind.

### 2.2.2 Biogenese von miRNAs

Die miRNA-Biogenese erfolgt in einem Multi-Schritt-Prozess wie in Abb. 2 beschrieben<sup>47</sup>.

1. Synthese des primären miRNA-Transkripts (pri-miRNA)
2. Prozessierung des naszierenden Transkripts zu einem ~70 nt *stem-loop* Vorläufer (pre-miRNA)
3. Export der pre-miRNA aus dem Zellkern
4. Prozessierung der ~70 nt pre-miRNA zu einem ~22 bp miRNA-Duplex
5. Freisetzung der ~22 nt reifen miRNA
6. Einbindung der reifen miRNA in den *RNA induced silencing complex (RISC)*
7. miRNA-Bindung an die 3'UTR der Ziel-mRNA und Regulation der Translation
8. Transport des mRNA/RISC-Komplexes zu den *P-bodies*

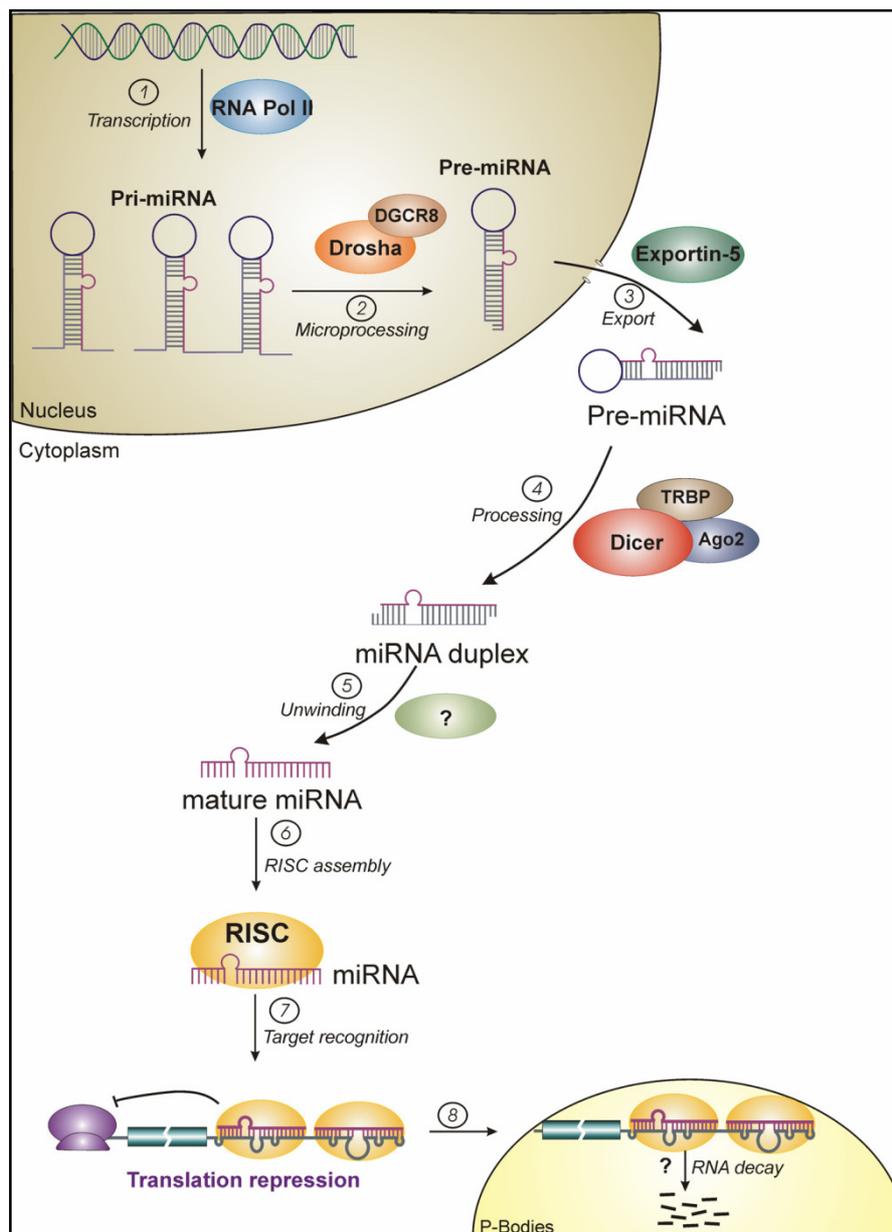


Abb. 2: Modell des miRNA-Biogenesezyklus. Details dazu im nachfolgenden Text. (Abbildung aus <sup>47</sup> entnommen und modifiziert).

### 2.2.2.1 miRNA Transkription

Die geringe Größe und die Lokalisation der miRNA Gene in intergenischen Regionen führte zu der Frage, wie die RNA-Polymerase fähig ist, miRNAs zu transkribieren. Eine zweite Frage war, ob miRNA Cluster als multiple, unabhängige transkriptionelle Einheit oder als längere, polycistronische Transkripte organisiert sind. Der erste Anhaltspunkt kam mit der Entdeckung von primären Transkripten (pri-miRNA), die deutlich länger waren als die *stem-loop* Vorläufer <sup>11,48</sup>. RT-PCRs und RNase *Protection Assays* zeigten, dass pri-miRNAs mehrere kb

lang sein können und dabei multiple miRNA-Vorläufer enthalten<sup>48</sup>. Als nächstes konnte nachgewiesen werden, dass die RNA-Polymerase II (Pol II) für die pri-miRNA Transkription verantwortlich ist (Abb. 2, Schritt 1)<sup>45</sup>. Zuvor wurde angenommen, dass die RNA-Polymerase III (Pol III) für die miRNA-Transkription verantwortlich ist, da sie auch für die Transkription anderer kleiner, nicht-codierender RNAs (tRNAs, 5S rRNA, U6 snRNA) zuständig ist. Nachfolgende Beobachtungen führten aber zu der Erkenntnis, dass die Mehrheit der miRNAs von der Pol II auf ähnliche Art und Weise wie Protein-codierende Gene und einige nicht-codierende Gene (U1-U5 snRNA) transkribiert werden.

#### 2.2.2.2 miRNA Reifung

Die Reifung der miRNAs erfolgt in mehreren Schritten und in verschiedenen Kompartimenten. Der erste Schritt ist die Spaltung der langen pri-miRNA Transkripte im Zellkern durch das Klasse II RNase III Enzym Drosha. Diese entlässt die ~70 nt *stem-loop* Vorläufer miRNA (Abb. 2, Schritt 2).

Drosha ist ein ~160 kDA nukleäres Protein, welches zwei RNase III katalytische Domänen (RIIIda und RIIIDb) und eine doppelsträngige RNA-Bindedomäne (dsRBD) in der C-terminalen Hälfte besitzt. Das amino-terminale Segment des Proteins enthält Prolin- und Serin/Arginin-reiche Regionen von unbekannter Funktion. Drosha ist ein konserviertes Protein. Homologe konnten in Mensch, Maus, *D. melanogaster* und *C. elegans* Genomen gefunden werden<sup>51</sup>. Drosha arbeitet nicht isoliert, sondern bildet einen großen Komplex von ~650 kDA mit dem DiGeorgeSyndrom kritischen Region Gen 8 (DGCR8) Protein in Säugern oder dem Pasha Protein in *D. melanogaster* und *C. elegans*<sup>52</sup>. Dieser Komplex wird als *microprocessor* bezeichnet. DGCR8 ist ein ~120 kDA Protein und besitzt eine dsRNA-Bindedomäne. Die Rolle von DGCR8 ist unklar. Es wird angenommen, dass es bei der Substraterkennung behilflich ist und die richtige Position der pri-miRNA auswählt<sup>50,52-54</sup>. Der Drosha-Komplex muss alle pri-miRNAs erkennen, selbst wenn ein Mangel an Sequenzhomologien vorliegt. Es wurde nachgewiesen, dass die Tertiärstruktur der pri-miRNA die Substratspezifität erzeugt. Die Effizienz der Drosha-Spaltung ist von der doppelsträngigen *stem*-Struktur (~30 bp), der terminalen *loop*-Stelle ( $\geq 10$  nt) und flankierenden Sequenzen abhängig<sup>49,55,56</sup>. Nach der Bindung des Drosha/DGCR8 *microprocessor*-Komplexes an die pri-miRNA bilden die beiden Drosha RNase III Domänen ein intramolekulares Dimer und schneiden die beiden Stränge etwa 22 nt vor der *stem-loop* Verbindung<sup>56</sup>. RIIIda spaltet dabei den 3'-Strang, während

RIIIDb einen Schnitt am 5'-Strang der pri-miRNA macht<sup>50</sup>. Die flankierenden Fragmente degradieren. Der freigelassene miRNA-Vorläufer hat typische Eigenschaften einer RNase III endonukleolytischen Spaltung: ein 5'-Phosphat und einen ~2 nt langen 3'-Überhang<sup>49,57</sup>.

Während des nächsten Schritts der miRNA-Reifung wird die entstandene pre-miRNA vom Zellkern in das Cytoplasma transportiert (Abb. 2, Schritt 3). Der pre-miRNA Export wird durch den nukleären Transportrezeptor Exportin 5 unter Ran-GTP Verbrauch vermittelt<sup>58,59</sup>. Exportin 5 ist ein Mitglied der Karyopherin-Familie von nukleären/cytoplasmatischen Faktoren. Für die nukleäre Frachtbindung benötigt das Karyopherin die GTP-gebundene Form der Ran-GTPase. Nach dem nukleären Export induziert eine cytoplasmatische Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP die Freisetzung der Fracht. Obwohl Exportin 5 auch tRNA und adenovirale VA1 nicht-codierende RNA exportieren kann, sind pre-miRNAs die Hauptfracht. Pre-miRNAs haben eine charakteristische Struktur, die für die Erkennung und den Export durch Exportin 5 notwendig ist: einen ~2 nt langen 3'-Überhang und einen RNA-Stamm, der länger als 16 bp ist<sup>60</sup>.

Im Cytoplasma wird die ~70 nt pre-miRNA durch das Klasse III RNase III Enzyme Dicer in die ~22 nt lange, reife miRNA prozessiert (Abb. 2, Schritt 4). Dicer ist ein konserviertes Protein, welches man in Pflanzen, Insekten, Würmern und Säugern findet. Manche Organismen enthalten multiple Dicer-Homologe. So hat *D. melanogaster* zwei: Dicer 1, für das miRNA-Prozessieren, und Dicer 2, für die siRNA-Bildung<sup>61</sup>. Dicer ist ein essentieller Bestandteil der miRNA-Biogenese und Mäuse, in denen Dicer ausgeschaltet ist, sterben während der frühen Embryonalentwicklung<sup>95</sup>. Dicer ist ein großes Protein von ~200 kDA und enthält zwei katalytische RNase III Domänen (RIIIda und RIIDb), eine dsRBD, eine Asp-Glu-Ala-Asp-Box (DEAD-Box), eine ATP-abhängige RNA Helicase Domäne, eine Piwi-Argonaut-Zwilli (PAZ) Domäne und eine DUF283-Domäne mit unbekannter Funktion<sup>62</sup>.

Die DEAD-Box RNA-Helicase Domäne hat wahrscheinlich zwei Funktionen: Entwindung des miRNA-Komplexes und Remodelierung des miRNA/miRISC-Komplexes<sup>63</sup>. Die PAZ-Domäne ist eine konservierte, RNA-binde Domäne, ähnlich der in Dicer und dem Argonaut-Protein. Sie erkennt die 3'-Überhangstruktur der pre-miRNA und interagiert vorzugsweise mit dem 3'-Ende. Dies deutet darauf hin, dass die PAZ-Domäne möglicherweise für die Erkennung des Substrats notwendig ist, welches durch die Drosha-Prozessierung generiert wurde<sup>64</sup>. Zudem wird durch die Interaktion mit der PAZ-Domäne diese an die Stelle der Dicer-Spaltung, am Stamm der pre-miRNA, positioniert<sup>65</sup>. Wie Drosha, bildet auch Dicer ein kata-

lytisches Zentrum durch intramolekulare Dimerisation der RNase III Domänen und schneidet den dsRNA Stamm ~20 bp vor seinem Ende. Dadurch entsteht das 5'-Phosphat-Ende und der ~2 nt lange 3'-Überhang. RIIIDa spaltet den 3'-Strang und RIIIDb den 5'-Strang des Vorläufers<sup>66</sup>. Das Spaltprodukt, eine ~22 nt lange dsRNA (miRNA:miRNA\* Duplex), ist ein transientes Zwischenprodukt. Es wird durch eine unbekannte Helikase entwunden. Ein Strang – miRNA\* – wird degradiert (Abb. 2, Schritt 5), der andere Strang in *RISC* eingebunden (Abb. 2, Schritt 6). Welcher Strang als reife miRNA ausgewählt wird, ist durch die relative thermodynamische Stabilität der beiden Enden des Duplexes bestimmt. Der Arm mit der weniger stabilen 5'-Hybridisierungsstruktur überlebt meistens<sup>67,68</sup>.

Kürzlich wurde gezeigt, dass Dicer in einem Komplex mit zwei anderen Proteinen arbeitet: dem doppelsträngige RNA Bindeprotein TRBP und dem Argonaut 2 Protein (Ago2)<sup>69-72</sup>. Die Funktion der beiden Proteine im Dicer-Komplex ist unklar. Vermutlich assistiert TRBP bei der Bindung des Substrats durch Dicer. Ago2 hilft bei der Freisetzung des gespaltenen Produkts vom Dicer-Komplex und bei der Ladung in *RISC*.

### 2.2.2.3 miRNA Inkorporation in den miRISC

Die reife miRNA inkorporiert in *RISC* (Abb. 2, Schritt 6). *RISC* ist ein Multi-Enzym-Komplex, der für die Spaltung der Ziel-mRNA im RNAi-Weg verantwortlich ist, aber nicht für die translationelle Repression im miRNA-Weg<sup>73</sup>. Komponenten von *RISC* sind auch in die transkriptionelle Stilllegung und die Heterochromatin-Bildung involviert<sup>74,75</sup>.

Die genaue *RISC*-Struktur wird weiter untersucht und kontinuierlich neue Komponenten identifiziert. Die Kernkomponenten von *RISC* sind Proteine aus der Argonaut-Familie, auch PPD-Proteine genannt, da sie alle PAZ und PIWI-Domänen enthalten. Die Anzahl von PPD-Proteinorthologen variiert von einer in *S. pombe* bis zu 24 in *C. elegans*<sup>76</sup>. Säuger besitzen vier Argonaut-Homologe: Ago1 bis Ago4. Ago2 ist einzigartig, da es RNase-Aktivität besitzt. Die Funktionen der restlichen Ago-Proteine im *RISC* sind bis jetzt unklar. Interaktionen der PIWI-Domäne mit Dicer inhibieren die Dicer-Ribonuklease-Aktivität<sup>77</sup>. Zudem fängt das Ago-Protein die miRNA durch eine einzelsträngige RNA-Binde-PAZ-Domäne<sup>64</sup>. Zusammengefasst kann davon ausgegangen werden, dass die Ago-Proteine möglicherweise die miRNA-Freisetzung vom Dicer-Komplex stimulieren und den Transfer der miRNA zum *RISC* kontrollieren.

Zusätzlich zu den Ago-Proteinen wurden mehrere andere Proteine mit *RISC* aufgereinigt. Es ist aber unklar, ob es sich dabei um Kernkomponenten des Komplexes handelt oder damit assoziierte Proteine, die wichtig für die Spezifität von *RISC* sind. Während der Ausbildung von *RISC* entwindet eine Helikase, wahrscheinlich Gemin 3, den miRNA-Duplex<sup>36</sup>. Bei diesem Vorgang bleibt die reife, einzelsträngige miRNA in dem Komplex gebunden und der Gegenstrang wird abgebaut. Dieses microRibonukleoprotein (miRNP) besteht damit aus der Zielgen-erkennenden miRNA und dem katalytischen Effektor-Komplex *RISC*.

Mehrere Gruppen haben die Lokalisation der *RISC*-Komponenten und miRNAs in Säugerzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Ago-Proteine in den cytoplasmatischen *P-bodies* lokalisiert sind<sup>78-80</sup>. Weiterhin resultiert die miRNA-Bindung an die Ziel-mRNA durch deren Assoziation mit den *P-bodies*. *P-bodies* sind kleine, diskrete, cytoplasmatische Herde, die als Zentren der mRNA-Zersetzung fungieren. *P-bodies* wurden in Tieren und Hefe-Zellen gefunden<sup>81</sup>. Die Kernkomponenten der *P-bodies* sind GW182 und Dcp1 Proteine. Beide Proteine sind in die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression involviert. Liu *et al.* haben gezeigt, dass das Ago-Protein physikalisch mit GW182 interagiert<sup>79</sup>. Zudem führt die Repression von GW182 zu einer Herunterregulation von miRNA-Funktionen<sup>79</sup>. Unklar bleibt aber, ob die *P-bodies* die Lagerstätten des miRNA-*RISC*-Komplexes sind oder ob die miRNA-abhängige translationelle Hemmung in den *P-bodies* stattfindet.

### 2.2.3 Mechanismen der miRNA-Funktion

Wenn die miRNA erst einmal in *RISC* inkorporiert ist, interagiert sie mit spezifischen Bindestellen in der 3'UTR der Ziel-mRNA und reguliert deren Expression. Dies geschieht entweder durch translationelle Repression oder durch mRNA-Degradation (Zusammenfassung in<sup>14</sup>). Die molekularen Details dazu werden immer noch untersucht.

#### 2.2.3.1 Translationelle Repression oder mRNA-Spaltung durch miRNA

Zurzeit existieren zwei Modelle für die Regulation der Ziel-mRNA durch miRNAs. Das erste Modell geht davon aus, dass miRNAs perfekt an die Zielstelle der mRNA binden und diese dadurch, ähnlich wie bei den siRNAs, gespalten wird. Daran angeschlossen ist die Degradation der mRNA. Das zweite Modell geht davon aus, dass nur eine partielle Übereinstimmung zwischen der miRNA- und der mRNA-Sequenz vorhanden ist und dies zu einer translationel-

len Repression ohne mRNA-Spaltung führt (Abb. 3). In Pflanzen liegt fast immer eine vollständige Übereinstimmung zwischen mRNA und miRNA vor<sup>82,83</sup>. Im Tierreich wurde dagegen nur eine kleine Anzahl von perfekten Übereinstimmungen gefunden. Das erste Modell kommt damit vorwiegend in Pflanzen, die translationelle Repression dagegen eher in Tieren vor. Es gibt aber auch Ausnahmen. So konnte in mehreren Fällen nachgewiesen werden, dass auch miRNAs in Tieren zu einer Spaltung der mRNA führen. Zum Beispiel hat die 3'UTR der *HOXB8*-mRNA einige fast perfekte Bindestellen für miR-196a. Diese fördert die Spaltung der mRNA während der embryonalen Mausentwicklung<sup>84,85</sup>. Zusätzlich konnte in verschiedenen Experimenten gezeigt werden, dass miRNAs die Spaltung von künstlichen Ziel-mRNAs mit perfekten Übereinstimmungen steuern können<sup>73,86</sup>. Dagegen können siRNAs zur translationellen Repression von teilweise passenden Ziel-mRNAs führen<sup>87</sup>. Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass der Grad der Übereinstimmung zwischen miRNA und seinen Bindestellen die Art der Regulation bestimmt.

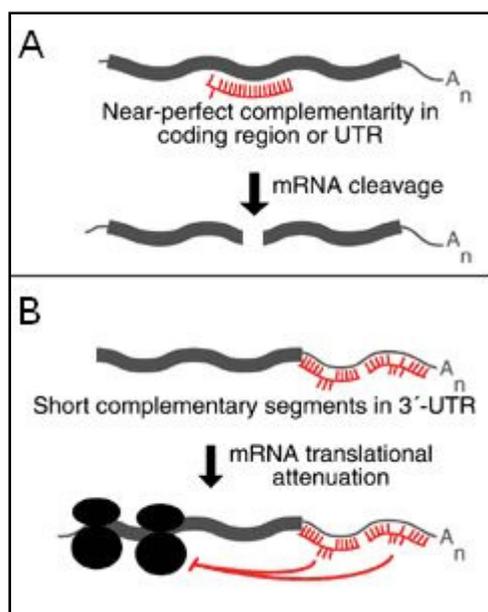


Abb. 3: Modelle über die Wirkungsweisen von miRNAs. (A) Fast perfekte Komplementarität zwischen Zielstelle und miRNA führt zur Degradation der mRNA. (B) Geringe Komplementarität führt zur Inhibition der Translation. Die Abbildung wurde von [www.wormbook.org](http://www.wormbook.org) übernommen und modifiziert.

Mehrere Studien zur translationellen Repression führten zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen. In der Originalstudie der *lin-4/lin14*-Interaktion in *C. elegans* wurden Ergebnisse präsentiert, die darauf hinweisen, dass die Hemmung erst nach der Translationsinitiation erfolgt. Die *lin-14*-mRNA assoziierte weiterhin stabil mit den Polysomen, was darauf hindeutet, dass es entweder zu einem Stillstand der translationellen Elongation oder einer cotranslationellen Peptiddegradation gekommen war<sup>24</sup>. Nach der derzeit verbreiteteren Vorstellung wird die Translation schon während der Initiation blockiert<sup>88,96,97</sup>. Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass die miRNA-vermittelte Genregulation das Proteinniveau des Zielgens beeinflusst

ohne einen Einfluss auf das mRNA-Niveau zu haben<sup>26</sup>, stehen neuere Erkenntnisse, die zeigen, dass miRNAs die Stabilität der Zielgen-mRNA beeinflussen<sup>98-100</sup>. Hierbei kann die mRNA, welche spezifisch durch miRNP gebunden ist, in die *P-bodies* transportiert werden<sup>80,88</sup>. Wurde das miRNP von der mRNA getrennt, kann es wieder in das Cytosol entlassen werden und dort weitere Ziel-mRNAs binden<sup>88</sup>. In den *P-bodies* kann die mRNA anschließend durch den Abbau des Poly-(A)-Schwanzes destabilisiert werden<sup>101,102</sup>. Zudem kann die Cap-Struktur entfernt werden. Dadurch wird ein Abbau durch die 5'-3'-Exonuklease XM 1 eingeleitet<sup>103</sup>. Ob nach dem Transport in die *P-bodies* eine Degradation der mRNA stattfindet oder nur die Translation blockiert wird, hängt wahrscheinlich von der Bindung weiterer Signalproteine ab<sup>113</sup>. Es wird angenommen, dass die mRNA zu einem späteren Zeitpunkt sogar wieder freigesetzt werden kann und damit in den *P-bodies* nur zwischengelagert wird (Zusammenfassung in<sup>89</sup>).

### 2.2.3.2 Prinzipien der miRNA Zielerkennung

Wie genau miRNAs ihre Ziele erkennen, ist immer noch unklar. Es scheint aber einige Regeln zu geben, die wichtig und allgemein gültig für die Erkennung des Ziels und den Interaktionsprozess sind. Ein wichtiges Signal bei der Zielerkennung stellt eine perfekte Komplementarität nach Watson-Crick von 6-7 nt im 5'-Bereich der miRNA dar<sup>15,93,104-106</sup>. Die Ausbildung dieser sogenannten *seed*-Sequenzen beginnt am zweiten und endet am siebten oder achten Nukleotid. Es wird angenommen, dass die *seed*-Sequenz das Kernelement der miRNA-vermittelten Regulation ist. Brennecke *et al.* haben die minimalen Voraussetzungen für einen funktionierenden miRNA:mRNA-Duplex evaluiert<sup>93</sup>. Sie konnten zeigen, dass eine *seed*-Sequenz für eine negative Regulation ausreichen kann, und dass eine Komplementarität, die über die *seed*-Sequenz hinaus geht, den Effekt verstärkt. Auch wenn eine einzelne Zielsequenz ausreichen kann, um eine negative Regulation des Zielgens zu bewirken<sup>105,93,114</sup>, wird die Effizienz durch eine kooperative Wirkung mehrerer Zielsequenzen verstärkt<sup>87,93</sup>.

Viele Arbeitsgruppen haben berichtet, dass untersuchte miRNA-Zielsequenz-Strukturen die beschriebenen Kriterien häufig zwar erfüllen, aber bei Validierungsexperimenten keinen Effekt zeigten<sup>31,90,91,105,107-109</sup>. Somit sind die Regeln, welche die Hybridisierungsstruktur betreffen, entweder noch nicht ausreichend präzise formuliert oder es spielen bislang völlig unberücksichtigte Faktoren eine Rolle, wie zum Beispiel RNA-bindende Proteine, die die Zielsequenz blockieren. Ebenso können Mutationen außerhalb einer validierten Zielsequenz

zum Verlust des regulatorischen Effekts führen<sup>115</sup>. Long *et al.* konnten zeigen, dass die Änderung der Sekundärstruktur der Zielgen-mRNA zum Verlust des Effekts führt<sup>115</sup>. Dies ist wahrscheinlich auf eine verringerte Zugänglichkeit für die miRNA zur Zielsequenz zurückzuführen. Somit spielt bei der Erkennung von miRNA-Zielen nicht nur die Zielsequenz selber eine Rolle, sondern auch die strukturelle Möglichkeit, an die Sequenz hybridisieren zu können.

### 2.2.3.3 Computergestützte Vorhersage von Ziel-mRNAs

MiRNA/Ziel-mRNA-Interaktionen haben viele Gemeinsamkeiten. Dadurch ist es mehreren Gruppen möglich gewesen, bioinformatische Algorithmen zu entwickeln, um miRNA-Zielgene in Säugern und Fliegen vorherzusagen und zu identifizieren<sup>90-92</sup>. Alle Methoden basieren auf der Analyse von Basenpaarungen zwischen miRNAs und experimentell validierten Zielen wie *let-7* und *lin-41* in *C. elegans*. Der Algorithmus zur Identifikation der Ziele basiert auf dem Vergleich von thermodynamischen Modellen der miRNA:mRNA-Interaktion und vergleichenden Sequenzanalysen mit den folgenden Kriterien:

- Die Lokalisation der miRNA-komplementären Elemente in der 3'UTR der mRNA.
- Die Konzentration der (fast-) perfekten Watson-Crick-Übereinstimmungen am 5'-Ende der miRNA (*seed*-Sequenz).
- Die freie Energie des miRNA:mRNA-Duplexes.
- Die phylogenetische Konservierung der Bindestelle zwischen orthologen Genen.

Viele dieser Vorhersage-Datenbanken sind im Internet verfügbar: miRanda (<http://www.microrna.org>), PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu>), Target Scan software (<http://genes.mit.edu/targetscan>).

Ein Vergleich der Ergebnisse mehrerer Vorhersageprogramme bei *D. melanogaster* zeigte, dass die Übereinstimmung der Ergebnisse meist nur gering ist<sup>110</sup>. Somit müssen weitere Kriterien für eine möglichst sensitive und gleichzeitig spezifische Vorhersage gefunden werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Zugänglichkeit der miRNA zur Zielsequenz und damit auch ihr Einfluss wahrscheinlich stark durch die Sekundärstruktur der 3'UTR beeinflusst wird<sup>111,115</sup>.

## 2.2.4 Funktionelle Charakterisierung von miRNAs

Hunderte miRNAs wurden kloniert und beschrieben, tausende von Zielen vorhergesagt. Experimentell validierte Funktionen sind aber nur für einige wenige miRNA-mRNA-Paare beschrieben. MiRNAs haben ein großes Spektrum an Funktionen, wie die zeitliche Steuerung während der Entwicklung, Zellproliferation und Apoptose, Zell- und Gewebeentwicklungsentscheidungen, Aufrechterhaltung der Gewebeidentität und tumorsupprimierende oder onkogene Wirkungen. Die Signifikanz von miRNAs während der Entwicklung wurde am überzeugendsten in Pflanzen demonstriert, wo die RNAi- und miRNA-Wege miteinander verflochten sind. So haben z.B. 15 der 17 bis jetzt identifizierten miRNAs in Pflanzen Ziele, bei denen es sich um regulatorische Transkriptionsfaktoren während der Entwicklung handelt<sup>116</sup>. Die anfänglichen Schwierigkeiten in der Zielgenvorhersage und der Mangel an genetischen Instrumenten haben ähnliche Untersuchungen in Tieren bis jetzt erschwert. In einigen Fällen konnte der Einfluss von miRNAs in fundamentalen zellulären Prozessen nachgewiesen werden. Dies geschah am häufigsten durch *loss-* oder *gain-of-function* Untersuchungen spezieller miRNAs. Die bekannten biologischen Funktionen von miRNAs sind in<sup>17,46,117</sup> und in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Funktion von ausgewählten miRNAs während der Entwicklung

Name	Funktion	Zielgen	Referenz
lin-4	<i>C. elegans</i> Entwicklung	lin-14, lin-28	21
let-7	<i>C. elegans</i> Entwicklung	lin-14, lin-28, lin-41, lin-42, daf-12	27
miR-196	embryonale Musterbildung	HOXD8	140
miR-124	neuronale Differenzierung	Laminin gamma 1 Integrin beta 1	141
miR-181	B-Lymphozyten-Differenzierung	unbekannt	142
	Myoblastendifferenzierung	HOX-A11	143
miR-375	Insulinsekretion	Myotrophin	144
miR-122	Leberentwicklung und -funktion	viele Gene	131

Durch das weite Spektrum an Funktionen, die durch miRNAs reguliert werden, handelt es sich um vielversprechende Kandidaten, die die Balance zwischen Tumorsuppressoren und Onkogenen aufrechterhalten können. Der erste Bericht, der diese Hypothese untermauerte, stammt von Calin *et al.*, die eine Region auf Chromosom 13q14 untersuchten, die häufig in chronisch lymphatischen Leukämien (CLL) deletiert ist<sup>118</sup>. Die Gruppe fand, dass die kleinste, in CLL fehlende Region zwei miRNA-Gene enthält, miR-15a und miR-16-1. Diese zwei

miRNAs stammen vom selben Primärtranskript und eine Herabregulation dieses Transkripts ist mit der 13q14-Deletion assoziiert. Die vorgeschlagene tumorsupprimierende Wirkung von miR-15a und miR-16-1 wurde durch die Entdeckung von Keimzellpunktmutationen in zwei CLL-Patienten unterstützt, bei denen es zu einer Akkumulation dieser beiden miRNAs kam<sup>119</sup>. Eine dritte Studie entschlüsselte den Mechanismus der miR-15/16-Tumorsuppression durch die Identifizierung von Zielgenen. Sowohl miR-15a als auch miR-16-1 erkennen Zielstellen in der 3'UTR von BCL2, einem anti-apoptotischen Onkogen<sup>120</sup>. Diese miRNAs kontrollieren das BCL2-Level in normalen Zellen, während die erhöhte Expression des Onkogens bei miRNA-Verlust zu CLL führt.

In letzter Zeit sind weitere miRNAs gefunden worden, deren Fehlexpression mit der Entstehung von Krebs assoziiert ist. Die Mehrzahl der miRNAs ist in Krebszellen herab reguliert<sup>121</sup>. In normalem Gewebe inhibieren ein Teil dieser miRNAs die Translation von Protoonkogenen. Diese miRNAs werden als „tumorsupprimierende miRNAs“ (*TS-miRNAs*) bezeichnet, da ihre eigentliche Aufgabe in der Expressionskontrolle von Onkogenen besteht. Im Gegensatz dazu sind andere miRNAs in Krebszellen herauf reguliert, agieren also als „*OncomiRs*“. Diese miRNAs inhibieren wahrscheinlich die Expression von Tumorsuppressoren in Krebszellen. In Tab. 2 sind miRNAs, die in die Krebsentstehung involviert sind und, wenn bekannt, ihre Zielgene aufgelistet.

Tab. 2: Auswahl an miRNAs, die in die Krebsentstehung involviert sind.

Name	Herauf- oder Herunterregulation	Krebsart	Zielgen	Referenz
miR-15, 16	herunter	CLL	BCL2	119,120
let-7	herunter	Lunge	RAS, MYC	132,133
miR-17-92 Cluster	herauf	Lunge	PTEN, RB2	134,135
miR-143, 145	herunter	colorektale Neoplasien	unbekannt	136
miR-21, 125b, 145, 155	herunter	Brust	unbekannt	137
miR-155	herauf	B-Zell Lymphome	unbekannt	138
miR-10b	herauf	metastasierender Brustkrebs	HOXD10	139

Die Mechanismen, durch welche die miRNA-Expression in Krebszellen gestört ist, sind vielfältig. Es scheinen aber dieselben Mechanismen zu sein, wie sie von der Expression protein-codierender Gene bekannt sind: Amplifikationen, Translokationen, Deletionen und Punktmu-

tationen der pri-miRNA-codierenden DNA-Sequenz sowie epigenetische Unterbrechungen der miRNA-Transkription. Eine Zusammenfassung der Mechanismen ist in <sup>177</sup> zu finden.

### 2.2.5 Diagnose, Prognose und Behandlungskontrolle durch miRNAs

Die Vielzahl an Beispielen von veränderter miRNA-Expression in Krebszellen führte zu Untersuchungen, ob und wie miRNA-Signaturen für die Diagnose, Prognose und Behandlungskontrolle von Krebserkrankungen genutzt werden können. Zuvor wurden dazu mRNA-Arrays ausgiebig untersucht und krankheitsspezifische und prognostische Signaturen identifiziert. Diese Technik konnte bislang aber nicht in die klinische Praxis übertragen werden, da dafür Frischmaterial benötigt wird, es Probleme mit der Reproduzierbarkeit auf verschiedenen Plattformen gibt, eine komplizierte bioinformatische Auswertung aufgrund der Datenmenge sich anschließt und hohe Kosten verursacht werden. Da die Anzahl von miRNAs limitiert ist, sie deutlich stabiler sind und damit auch aus FFPE-Material extrahiert werden können, ist die Übertragung in den Klinikgebrauch deutlich einfacher. Zudem wird angenommen, dass miRNAs durch ihre regulatorische Wirkung auf die Proteinexpression deutlich besser als Marker geeignet sind als mRNA-Expressionsprofile, da diese nur in geringer Zahl regulatorische Wirkungen haben <sup>126</sup>.

Es gibt verschiedene Beispiele wie miRNA-Expressionsprofile für die klinische Diagnose genutzt werden können. So können miRNA-Expressionsprofile zwischen normalem und malignem Gewebe unterscheiden, wobei es zu einer generellen Herabregulation von miRNAs in Malignomen im Vergleich zu gesundem Gewebe kommt. Solche Profile wurden für eine große Anzahl von Krebsarten identifiziert: Leberkarzinome <sup>122</sup>, Pankreaskarzinome <sup>127,128</sup>, CLL <sup>129</sup>, Colonkarzinom <sup>123</sup> und Lungenkrebs <sup>125</sup>. Des Weiteren waren frühere Versuche, schlecht zu unterscheidende Tumore durch mRNA-Expressionsprofile zu klassifizieren, meistens relativ erfolglos <sup>130</sup>. Im Gegensatz dazu gelang es Lu *et al.*, durch miRNA-Expressionsprofile Tumore zu unterscheiden, bei denen eine histologische oder mRNA-basierte Diagnose nicht erfolgreich war <sup>121</sup>. Ein Grund für diese Überlegenheit der miRNA-Expressionsprofile im Vergleich zu mRNA-Profilen könnte darin liegen, dass miRNAs direkt in die Gewebeentstehung und -differenzierung involviert sind.

Neben der besseren Diagnose durch miRNAs sind in letzter Zeit mehrere Publikationen veröffentlicht worden, in denen miRNAs auch als prognostischer Parameter verwendet wurden. Bis jetzt wurden miRNA-Signaturen identifiziert, die a) die Zeit bis zur Notwendigkeit einer ers-

ten Behandlung in CLL vorhersagen können<sup>124</sup>, b) mit aggressivem Wachstum und Lebermetastasen bei Pankreaskarzinomen assoziiert sind<sup>127</sup> und c) mit Überlebensraten in Lungenadenokarzinomen assoziiert sind<sup>125</sup>. In der letzt genannten Studie konnte die miR-155 durch Cox-Regression als unabhängiger negativer Prognosefaktor identifiziert werden.

## 2.3 Lymphome

### 2.3.1 Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome

Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCLs) sind mit etwa 30% aller neu diagnostizierten Fälle und mehr als 80% der aggressiven Lymphome, der verbreitetste Typ von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHLs)<sup>145</sup>. DLBCLs stellen eine sehr heterogene Gruppe dar. Verschiedene morphologische Varianten in der WHO-Klassifikation, eine Vielzahl von molekularen und genetischen Anomalitäten sowie Patienten mit einem großen Spektrum an klinischen Erscheinungsbildern und Überlebensraten sind bekannt. Die CHOP-Chemotherapie (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon) war über Dekaden hinweg die Therapie der Wahl. Erst der Einsatz von monoklonalen Antikörpern hat die Behandlungsstrategien für aggressive Lymphome in den letzten Jahren deutlich verbessert. Die Groupe d'Etude de Lymphome d'Adultes (GELA) beschrieb erstmals den positiven Effekt von Rituximab, einem chimären IgG1 monoklonalem CD20-Antikörper, während der CHOP-Chemotherapie (R-CHOP) älterer DLBCL-Patienten ( $\geq 60$  Jahre)<sup>146</sup>. Weitere Studien, die ebenfalls einen positiven Effekt der Antikörper-Therapie zeigten, folgten in den kommenden Jahren. 1993 wurde der internationale prognostische Index (IPI) eingeführt und hat sich seit dem zur besten Vorhersage über den Krankheitsverlauf entwickelt<sup>152</sup>. Der IPI beinhaltet mehrere Faktoren (Alter  $\geq 60$  Jahre, Stadium III/IV, erhöhte Serum Laktat-Dehydrogenase Konzentration, „Performance Status“ 2 oder größer, Anzahl der extranodalen Erkrankungsstellen), die jeweils mit einem Punkt bewertet werden. Ist die Summe aller Punkte 0 oder 1 liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei mehr als 70%. Dagegen fällt diese Rate bei Patienten mit 4 oder 5 Punkten auf 20%<sup>147</sup>. Verschiedene klinische Untersuchungen haben den Erfolg der R-CHOP-Therapie in den unterschiedlichen IPI-Gruppen analysiert. Allgemein ist der Krankheitsverlauf durch R-CHOP im Vergleich zur konventionellen Therapie in allen Gruppen deutlich verbessert, weitere Untersuchungen, zur genaueren Aufschlüsselung über die Bedeutung einzelner Faktoren, sind aber notwendig<sup>146,148,149</sup>.

Durch die Analyse von mRNA-Expressionsprofilen konnten DLBCLs in zwei Gruppen unterteilt werden<sup>176</sup>. Die erste Gruppe ergibt ein Expressionsmuster, welches dem von normalen germinalen B-Zellen ähnelt und wurde deshalb als Keimzentrumstyp (GCB) bezeichnet. Die zweite Gruppe zeigt dagegen nur geringe/keine GCB-Signaturen. Das Expressionsmuster entspricht vielmehr dem nach einer *in vitro* Aktivierung von peripheren B-Zellen. Aus diesem Grund wurde diese Gruppe als aktivierter B-Zell-Typ (ABC) bezeichnet. Basierend auf den Genexpressionsdaten wurde auch nach immunhistochemischen Algorithmen gesucht, die eine Unterscheidung in GCB- und ABC-DLBCLs ermöglichen. Hans *et al.* gelang, unter Zuhilfenahme der Daten von CD10, BCL6 und MUM1-Färbungen, eine relativ einfache Unterscheidung der DLBCLs in eine GCB- und eine non-GCB-Gruppe<sup>248</sup>. Diese Unterteilung zeigt sogar eine bessere Korrelation mit dem Überleben, als sie durch Genexpressionsanalysen gegeben ist.

Genetische Aberrationen kommen in DLBCLs häufig vor. Die meisten Tumore zeigen Veränderungen in den leichten und schweren Ketten der Immunglobuline, aber auch somatische Mutationen in den variablen Regionen. Im Gegensatz zu einigen anderen NHLs sind DLBCLs nicht durch eine regelmäßig wiederkehrende cytogenetische Anomalität definiert. Ein breites Spektrum an genetischen Unregelmäßigkeiten wurde in DLBCLs gefunden, z. B. strukturelle Alterationen (balancierte und unbalancierte Translokationen), numerische Veränderungen (Aneuploidien) und Punktmutationen. Die (14;18)(q32;q21)-Translokation, die üblicherweise mit Follikulären Lymphomen assoziiert ist, wurde in einem Drittel der DLBCL-Fälle gefunden. Diese Translokation führt zu einer Umlagerung des *bcl-2* Gens von Chromosom 18 zur schweren Kette des Immunglobulins auf Chromosom 14 und ist häufiger im GCB-Typ der DLBCLs zu finden<sup>165-167</sup>. Im Gegensatz dazu ist der ABC-Typ der DLBCLs durch chromosomale Zugewinne oder Amplifikationen in 3q und 18q21-22 sowie Verluste in 6q21-q22 charakterisiert<sup>168</sup>. Wichtig ist auch die konstitutive Aktivität des NF-κB-Weges in ABC-Typen<sup>169,170</sup>. In retrospektiven Studien zeigten GCB-Patienten zudem ein besseres Gesamtüberleben im Vergleich zu ABC-Patienten (60% vs 35%)<sup>165</sup>.

### 2.3.2 Follikuläre Lymphome

Bei Follikulären Lymphomen (FLs) handelt es sich um die zweithäufigste Gruppe von Lymphomen, mit etwa 70% aller indolenten Lymphome und 22% aller NHL-Neuerkrankungen<sup>145</sup>. Die meisten Patienten befinden sich bei der Diagnose in einem fortgeschrittenen Stadium. Das

mittlere Überleben beträgt 8-10 Jahre, eine starke Schwankungsbreite wird aber beobachtet. Während einige Patienten mit langsam fortschreitender Erkrankung über Dekaden ohne Behandlung auskommen, zeigen andere Patienten ein rasches Voranschreiten und einen dringenden Therapiebedarf. Transformationen in aggressive Lymphome finden bei 25-60% aller Patienten statt und verschlechtern die Prognose deutlich <sup>154</sup>. Der FL internationale prognostische Faktor (FLIPI) beinhaltet mehrere unabhängige Faktoren (Alter, Ann Arbor Stadium, Hämoglobinlevel, Anzahl der extranodalen Erkrankungsstellen, Serum-Laktat-Dehydrogenase Konzentration), aus denen anschließend eine klinische Prognose über den Krankheitsverlauf erstellt werden kann <sup>153</sup>.

Das kennzeichnende genetische Ereignis von FLs ist die t(14;18)-Translokation, welche das *bcl2*-Gen zur schweren Kette des Immunglobulins umlagert. Dies führt zur konstitutiven Expression des anti-apoptotischen BCL2-Proteins. Dieses frühe molekulare Ereignis findet in 85% der FLs vom Grad 1 und 2 statt, ist aber nicht alleinige Ursache einer Erkrankung. FLs ohne t(14,18)-Translokation findet man häufiger beim Grad 3b. Die, auch in diesen Fällen zu findende, BCL2-Überexpression erfolgt über die Aktivierung alternativer Mechanismen. Die durchschnittliche Anzahl an Aberrationen ist bei der Diagnose sehr variabel, mit der Tendenz für einen höheren Grad bei einer größeren Anzahl von Aberrationen. Obwohl verschiedene Mutationen (*c-myc* oder *p53*) mit der Entwicklung von Transformationen assoziiert sind, korreliert die Komplexität des FL-Karyotypen bei der Diagnose nicht mit der Entwicklung von nachfolgenden Transformationen <sup>163</sup>. Regelmäßig wiederkehrende cytogenetische Ereignisse sind mit einem schlechten Überleben korreliert. Dazu gehören eine Vielzahl von chromosomalen Zugewinnen (+7, +12g13-14, +18q) und Verlusten (del6q, -9p21, -17p13) <sup>151</sup>. Eine BCL6-Translokationen findet man seltener in FLs vom Grad 1 und 2, aber in 18% vom Grad 3a und in 44% vom Grad 3b. Diese ist zusätzlich mit einem Transformations-Risiko korreliert <sup>158,159</sup>. Durch Genexpressionsstudien konnten zwei Subtypen definiert werden, die stark mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung korrelieren <sup>150</sup>. Die Immunantwort-Signatur 1 (IR 1) ist dabei mit der Expression von T-Zellen, Makrophagen und follikulären dendritischen Zellen assoziiert, die Immunantwort-Signatur 2 (IR 2) dagegen eher mit Genen, die in Makrophagen exprimiert werden.

## 2.4 Ziele dieser Arbeit

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die Erstellung von miRNA-Expressionsprofilen für DLBCLs, FLs und Lymphknoten. Zu Beginn der Arbeit war bereits bekannt, dass miRNAs für die Klassifizierung verschiedener Neoplasien geeignet sind<sup>121</sup>. Für die Unterscheidung verschiedener Lymphomentitäten gab es aber noch keine publizierten Ergebnisse. Aus diesem Grund sollten die gewonnenen miRNA-Expressionssignaturen miteinander verglichen werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf folgende Punkte gelegt werden:

- Ist es möglich die beiden Lymphomentitäten durch ihre miRNA-Expressionen voneinander zu unterscheiden?
- Kann auch allgemein zwischen malignem und nicht-malignem Gewebe unterschieden werden? Gibt es lymphom- bzw. krebsspezifische miRNAs?
- Zeigen die beiden DLBCL-Untergruppen GCB und non-GCB verschiedene miRNA-Signaturen?
- Ist es möglich miRNAs herauszufiltern, die für die Diagnose bzw. Prognose des Krankheitsverlaufes eine wichtige Rolle spielen?

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten detaillierte Untersuchungen zur miR-205 vorgenommen werden. Zum Zeitpunkt der Erstellung von miRNA-Expressionssignaturen für Tonsillen und Lymphknoten existieren noch keine Veröffentlichungen über miR-205. Deswegen sollten genaue beschreibende und funktionelle Analysen durchgeführt werden um die deutlichen Expressionsunterschiede zwischen den beiden lymphatischen Geweben zu klären. Dabei sollten besonders auf die folgenden Fragen Antworten gefunden werden:

- In welchen Organen bzw. Geweben wird die miR-205 vorzugsweise exprimiert?
- Ist eine genaue Lokalisation der Expression in einem bestimmten Zelltyp möglich?
- Welche Funktion übernimmt die miR-205 in diesen Zelltypen?
- Ist es möglich Zielgene von miR-205 herauszufiltern? Wenn ja, ist eine direkte Interaktion der beiden Partner nachweisbar?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Organismen

###### 3.1.1.1 Zelllinien

Tab. 3: Zelllinien

Zelllinie	Klinik	DSMZ-Nummer
T24	Humane Harnblasen-Karzinomzelllinie	ACC376
KU-19-19	Humane Harnblasen-Übergangs-Karzinomzelllinie	ACC 395
TCC-SUP	Humane Harnblasen-Übergangs-Karzinomzelllinie	ACC 377
JURKAT	Humane T-Zell-Leukämiezelllinie	ACC 282
U937	Humane histiozytische Lymphomzelllinie	ACC 5
RAMOS	Humane Burkitt-Lymphomzelllinie	ACC 603
HEK-293	Humane embryonale Nierenzelllinie, durch Adenovirus Typ 5 transformiert	ACC 305

###### 3.1.1.2 Stämme von *Escherichia coli* (*E. coli*)

Tab. 4: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Transformations-Art
E. coli TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Chemisch
E. coli StB12	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mcrBC</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mrr</i> ) <i>recA1</i> <i>endA1lon</i> <i>gyrA96</i> <i>thi</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> $\lambda$ $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> )	Chemisch

###### 3.1.2 Patientenmaterial

Die Gewebeproben für die miRNA-Expressionsstudien von 58 Patienten mit DLBCL, 46 Patienten mit FL und 7 Lymphknoten mit geringen reaktiven Veränderungen wurden für das miRNA-Profilierung verwendet. Die Patienten mit DLBCL wurden im Rahmen der Deutschen Studiengruppe Hochmaligner Non-Hodgkin Lymphome (DSHNHL) <sup>171,172</sup> behandelt. Die Gewebeproben mit einem geringgradigen FL wurden aus den Archiven der Pathologien des UKS-H (Lübeck) und der Semmelweis Universität (Budapest) entnommen. Alle FLs waren ersten und zweiten Grades und enthielten keine Transformationen zu DLBCLs. Die Gewebeproben zur Untersuchung der Expression von miR-205 stammten aus dem Archiv der Pathologie des UKS-H (Lübeck).

### 3.1.3 Antikörper

Tab. 5: Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Hersteller	Arbeitskonzentration (Western Blot)
$\alpha$ -Tubulin (B-7)	monoklonaler Maus-Antikörper gegen Tubulin; Primärantikörper	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
$\alpha$ -ARTS (ARTS51)	monoklonaler Maus-Antikörper gegen ARTS; Primärantikörper	Sigma-Aldrich	1:1000
$\alpha$ -PKC $\beta$ II (Y125)	monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen PKC $\beta$ II; Primärantikörper	Epitomics	1:100 (Immunhistochemie)
$\alpha$ -INPPL1 (ab55312)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen INPPL1; Primärantikörper	abcam	1:500
$\alpha$ -Prohibitin (Il-14-10)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen Prohibitin; Primärantikörper	abcam	1:250
$\alpha$ -rabbit HRP	HRP-gekoppelter polyklonaler Ziegenantikörper; Sekundärantikörper	Pierce	1:2000 (Immunhistochemie)
$\alpha$ -mouse HRP	HRP-gekoppelter polyklonaler Ziegenantikörper; Sekundärantikörper	Pierce	1:10000

### 3.1.4 Vektoren

Tab. 6: Vektoren

Bezeichnung	Größe [kb]	Nutzung	Quelle
pRL-TK	4,0	<i>Renilla</i> -Luciferase-Reportervektor	Promega
pGL3-Control	4,8	<i>Firefly</i> -Luciferase-Reportervektor	Promega
pCR <sup>®</sup> II-TOPO	3,9	Klonierungen	Invitrogen
pCR2.1-TOPO	4,0	Klonierungen	Invitrogen

### 3.1.5 Oligonukleotide

Die Primer wurden von der Firma TIB Molbiol bezogen. Das Lyophilisat wurde in HPLC-aufgereinigtem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Es ist angegeben, welche Restriktionsschnittstellen mittels PCR generiert wurden. Die Sonden, für die quantitative RT-PCRs, stammten aus dem humanen *Universal ProbeLibrary Set* der Firma Roche Diagnostics.

Tab. 7: Primer

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5'-3'-Orientierung)	Nutzung	generierte Schnittstelle
TP53BP2_f1	AACCCGGCGAGAGTGATT	quantitative RT-PCR	
TP53BP2_r1	TGGCCAACATGATGAAACTC	quantitative RT-PCR	
E2F5_f1	GCAGCAGACATCAGCTACAGA	quantitative RT-PCR	
E2F5_r1	GACATTAACATCAATGATATCTCCA	quantitative RT-PCR	
PHB_f1	GCCAAACAGGTGGCTCAG	quantitative RT-PCR	
PHB_r1	CGCCTTTTCTGTTGCTCA	quantitative RT-PCR	
ERBB3_f1	CACAATGCCGACCTCTCC	quantitative RT-PCR	
ERBB3_r1	CACGAGGACATAGCCTGTCA	quantitative RT-PCR	
SMAD1_f1	TGTGTACTATACGTATGAGCTTTGTGA	quantitative RT-PCR	
SMAD1_r1	TAACATCCTGGCGGTGGTA	quantitative RT-PCR	
PBGD_UPS_for	AGCTATGAAGGATGGGCAAC	quantitative RT-PCR	
PBGD_UPS_rev	TTGTATGCTATCTGAGCCGTCTA	quantitative RT-PCR	
DGCR8_f1	AAAACCTTGGGAAGAATAAAGCTG	quantitative RT-PCR	
DGCR8_r1	TTTAACAAAGTCAGGGATGAGGA	quantitative RT-PCR	
PRKCB_f1	CCAGTGTGATGGCTGGTT	quantitative RT-PCR	
PRKCB_r1	GGCACAGGCACATTGAAGTA	quantitative RT-PCR	
E2F1_f1	TCCAAGAACCACATCCAGTG	quantitative RT-PCR	
E2F1_r1	CTGGGTCAACCCCTCAAG	quantitative RT-PCR	
INPPL1_f1	GAACCGTATCAGCCATGTCA	quantitative RT-PCR	
INPPL1_r1	TGAAGGAGACGCCACAG	quantitative RT-PCR	
ARTS_f1	GGGATGCAGTCAACAACACA	quantitative RT-PCR	
ARTS_r1	TGCTCAAACCTGCTGATCAATG	quantitative RT-PCR	
Oligo d(T)	TTTTTT	Reverse Transkription	
Hexa N	NNNNNN	Reverse Transkription	
utrARTS_f1	GCGTCTAGAGGCTGGGGCAAAGGCCTGAAA	Amplifikation der 3'UTR von ARTS	<i>Xba</i> I
utrARTS_r1	GCGTCTAGAAGCCACCTACAGATTTATTAAAC TTTATTTCTCTGAGTCT	Amplifikation der 3'UTR von ARTS	<i>Xba</i> I
SeqARTS_f1	CAGGTGGTCAAGGTTCTCTG	Sequenzierung der 3'UTR von ARTS	
SeqARTS_f2	AATCGCAAGTATGACCAGAA	Sequenzierung der 3'UTR von ARTS	
SeqARTS_f3	GGCTGGGGCAAAGGCCTGAAA	Sequenzierung der 3'UTR von ARTS	
SeqARTS_r1	AGCCACCTACAGATTTATTA	Sequenzierung der 3'UTR von ARTS	
SeqARTS_r2	CTTACCACCAGGCGGGTCA	Sequenzierung der 3'UTR von ARTS	
SeqARTS_r3	AGTGCACCCTGTTGTCTTGG	Sequenzierung der 3'-UTR	

		von ARTS	
SeqARTS_f4	CACTGCTGCCTGTACTTCAT	Sequenzierung der 3'UTR von ARTS	
utrINPP_f1	GCGTCTAGATAGCGGAGGCACCACGAAG	Amplifikation der 3'UTR von INPPL1	<i>Xba</i> I
utrINPP_r1	GCGTCTAGACCAAATAAACTTAATTTATTGA AGACATCACGCCGC	Amplifikation der 3'UTR von INPPL1	<i>Xba</i> I
SeqINPP_f1	TAGCGGAGGCACCACGAAGC	Sequenzierung der 3'UTR von INPPL1	
SeqINPP_f2	CTGGGGAGGGAGAGCACCTT	Sequenzierung der 3'UTR von INPPL1	
SeqINPP_r1	CCAAATAAACTTAATTTATTGAAGACAT	Sequenzierung der 3'UTR von INPPL1	
SeqINPP_r2	AACCAGGGTCCTCGGTAACC	Sequenzierung der 3'UTR von INPPL1	

### 3.1.6 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Lösungen, Medien und Puffer wurden mit zweifach destilliertem oder HPLC-gereinigtem Wasser angesetzt. Der pH-Wert von Lösungen wurde mit NaOH- und HCL-Lösungen entsprechender Verdünnungen und Normalitäten eingestellt. Die Lösungen wurden, wenn nötig, in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven für 20 min bei 121°C und  $1,013 \times 10^5$  pa Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Substanzen, wie Antibiotika, wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen dem Medium zugegeben.

Ampicillin-Stammlösung:	100 mg/ml Ampicillin
APS-Lösung:	10% (w/v) APS
Blottpuffer:	250 mM Tris; 1,92 M Glycerin; 0,01% (v/v) SDS
Gelladepuffer:	62,5% (v/v) Glycerin; 0,4% (v/v) SDS; 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Blockreagenz:	10% (w/v) Milchpulver in 1× TBST
Coomassie Brilliant Blue:	45% (v/v) H <sub>2</sub> O; 45% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Eisessig; 92% (w/v) Coomassie
Einfriermedium:	DMEM / RPMI; 10% (v/v) FCS; 10% (v/v) DMSO
Entfärbelösung:	73% (v/v) H <sub>2</sub> O; 20% (v/v) Methanol; 7% (v/v) Essigsäure
Laemmli-Probenpuffer (4×):	2% (w/v) SDS; 240mM Tris-HCl pH 6,8; 40% (v/v) Glycerin; 0,02% (v/v) Bromphenolblau; 1% (v/v) β-Mercaptoethanol

Laufpuffer:	125 mM Tris; 1,25 M Glycerin; 0,1% (v/v) SDS
LB-Medium:	1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,5% (w/v) NaCl; pH 7,5
LB-Festmedium:	LB-Medium; 1,5% (w/v) Agar-Agar
MTT-Lysepuffer:	10% (v/v) SDS in 0,01 M HCl
MTT-Salzlösung:	5 mg/ml MTT-Salz in PBS
PBS (10×):	1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Sammelgelpuffer:	125 mM Tris; 0,1% SDS, pH 6,8
SOC-Medium:	0,5% (w/v) Hefeextrakt; 2% (w/v) Trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glucose
TAE (50×):	2 M (w/v) Tris-HCl; 1 M (v/v) Eisessig; 0,1 M EDTA, pH 7,6
TBE (10×):	1 M Tris-Borat pH 7,9; 20 mM EDTA
TBST:	0,2 M Tris-HCL pH 7,6; 1,37 M NaCl; 0,1% (v/v) Tween-20
Trenngelpuffer:	375 mM Tris; 0,1% (v/v) SDS; pH 8,8

### 3.1.7 Nährmedien

Tab. 8: Nährmedien

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
RPMI	RPMI1640 Medium +25mM HEPES +Glutamin	Biochrom AG
DMEM	Dulbecco's MEM, 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 4,5 g/l D-Glucose, 1,028 g/l stabiles Glutamin	Gibco® Invitrogen
OPTI-MEM	Serumfreies MEM	Gibco® Invitrogen

### 3.1.8 Enzyme, Chemikalien, Geräte und Sonstiges

#### 3.1.8.1 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck, Roth oder Sigma-Aldrich im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen.

*3.1.8.2 Reagenzien*

Rotiphorese Gel 40	Roth
Agarose „Molecular Biology Grade“	Eurogentec
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Anti-miR <sup>TM</sup> miRNA Inhibitor	Ambion
Bacto-Tryptone	BD Biosciences
Bromphenolblau	Serva Elektrophoresis
DEPC-treated water	Ambion
DMSO	Merck
DTT	Invitrogen
Ethidiumbromid	Serva
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco <sup>®</sup> Invitrogen
HPLC-H <sub>2</sub> O	Roth
LB-Medium	Roth
Lipofektamin <sup>TM</sup> 2000	Invitrogen
Milchpulver	Roth
MTT-Salz	Roche Diagnostics
PCR Nucleotide Mix	Roche Diagnostics
Pre-miR <sup>TM</sup> miRNA Negative Control #1	Ambion
Pre-miR <sup>TM</sup> miRNA Precursor	Ambion
Trypanblau	Sigma
Trypsin	Seromed/Biochrom

*3.1.8.3 Enzyme, DNA-Längenmarker und RNase-Inhibitoren*

1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics, New England Biolabs
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Roche Diagnostics
Superscript III RNase H	Invitrogen

T4 DNA Ligase	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics, New England Biolabs

#### 3.1.8.4 Kits

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Light Cycler® Taq Man Master	Roche Diagnostics
miR Vana™ miRNA Isolation Kit	Ambion
PCR Core Kit	Roche Diagnostics
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
puREtaq Ready-To-Go PCR Beads	GE Healthcare
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation	Ambion
Universal ProbeLibrary Set, Human	Roche Diagnostics
TaqMan® Micro RNA Assay	Applied Biosystems
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	Applied Biosystems
Topo TA Cloning® Kit	Invitrogen
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent	PerkinElmer Life Sciences

#### 3.1.8.5 Geräte

7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Abzüge	Captair, Heraeus Instruments
Agarose-Elektrophoresekammern	Pharmacia, Bio-Rad
Agarose-Geldokumentationsanlage	Cellcame
Elektrophorese-Netzgeräte	Bio-Rad, Pharmacia

ELISA-Reader	Anthos labtec instruments
Feinwaagen	Ohaus, Kern
Filmkassette (X-Omatic cassette)	Kodak
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Hybridisierungsöfen	Hybaid, Appligene
Inkubator für Zellkultur, CO <sub>2</sub> -begast	Heraeus Instruments
Kühlzentrifuge	Heraeus Instruments
Laser-Mikrodissektionsgerät (PALM Combi System)	Zeiss
Light Cycler <sup>®</sup> 1.5	Roche Diagnostics
Light Cycler <sup>®</sup> 480	Roche Diagnostics
Luminometer (MicroLumat LB96P)	EG&G Berthold
Magnetrührer	Ikamag
Mehrkanalpipetten	Eppendorf
Mikroskop	Olympus
Mikroliter-Pipetten	Eppendorf
Minishaker	Sarstedt
Picofugen	Sarstedt, Stratagene
Pipetus <sup>®</sup> Pipetboy	Hirschmann Laborgeräte
SDS-PAGE-Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN <sup>®</sup> 3 Cell)	Bio-Rad
Schüttelinkubator	Gerhardt
Sicherheitswerkbänke Klasse II	Heraeus Instruments
Standzentrifuge	Beckman
Thermocycler T1	Biometra
Thermomixer	Gerhardt, Eppendorf
Tischzentrifugen	Beckman, Heraeus Instruments, Eppendorf
UV-Spectrophometer	NanoDrop Technologies
UV-Tisch	LTF-Labortechnik
Vertikalschüttler	Gerhardt
Wasserbäder	GFL, Köttermann Labortechnik

Wet-Blottingkammer	Bio-Rad Laboratories
Zählkammer nach Neubauer	Blau Brand

### 3.1.8.6 Verbrauchsmaterialien

13 ml Röhren	Sarstedt
15 ml Röhren	Sarstedt
50 ml Röhren	Sarstedt
96-Well-Reaktionsplatten	Roche Diagnostics, Applied Biosystems
Einfrierröhrchen	Nunc
Eppendorf-Gefäße	Sarstedt
Folienhalbschlauch	Roth
Gewebekulturplatten	Greiner
Glaskapillaren	Roche Diagnostics
Imobilon-P Transfer Membrane; PVDF; 0,45 µm	Millipore
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Roche Diagnostics
Kopierfolie	Staedtler
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten	Assistent
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Eppendorf, Greiner
Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm™ ECL)	GE Healthcare
Serologische Pipetten	Sarstedt
Skalpelle	Feather/PFM
Sterilfilter	Millipore
UPP-110 HG Filme	Sony
Wägeschälchen	Hassa
Whatman 3MM-Papier	Whatman International
Zellkulturflaschen und -schalen	Sarstedt
Zellkultur-Multiwell-Platten	Falcon, BD Pharmingen
Zellschaber	Sarstedt

### 3.1.8.7 *In silico* Ressourcen

Tab. 9: In silico Ressourcen

Programm	URL
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed</a>
Ensembl Genom Browser	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
UCSC Genom Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>
Webcutter	<a href="http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/">http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/</a>
Primer3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi</a>
RNAhybrid	<a href="http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/">http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/</a>
TargetScan	<a href="http://www.targetscan.org">http://www.targetscan.org</a>
PicTar	<a href="http://pictar.bio.nyu.edu/">http://pictar.bio.nyu.edu/</a>
MiRanda	<a href="http://www.microrna.org/">http://www.microrna.org/</a>
miRBase	<a href="http://microrna.sanger.ac.uk/">http://microrna.sanger.ac.uk/</a>
Universal ProbeLibrary Assay Design Center	<a href="http://qpcr.probefinder.com">http://qpcr.probefinder.com</a>

### 3.1.8.8 Dienstleistungen

Alle Sequenzierungen erfolgten durch die Firma SeqLab. Die statistischen Auswertungen der miRNA-Expressionsprofile von DLBCLs und FLs wurden von Dr. Dirk Repsilber (FBN, Dummerstorf) und Dipl.-Math. Marita Ziepert (IMISE, Leipzig) durchgeführt. Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten durch die Mitarbeiter/-innen des Labors für hämatologische Diagnostik im Institut für Pathologie.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Kultivierung permanenter Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in DMEM oder RPMI kultiviert, welche mit 10 bzw. 20% fötalem Kälberserum (FCS) supplementiert waren. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre gehalten. Adhärente Zellen wurden zur Subkultivierung mit PBS serumfrei gewaschen, mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA aus der Kulturflasche gelöst, mit Medium gewaschen und in der gewünschten Dichte neu ausplattiert. Die Zentrifugationsschritte erfolgten in 15 ml bzw. 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 300×g für 5 bis 10 min.

#### 3.2.1.2 Aufbewahrung von Zelllinien

Zur Kryokonservierung wurden  $1 \times 10^7$  Zellen abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in vorgekühlte Einfrierröhrchen gegeben und für 10 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen eingefroren und bei -80°C gelagert oder für eine längere Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zur Reaktivierung wurden die Zellen in vorgewärmten Kulturmedium (37°C), mit 10 bzw. 20 % FCS verdünnt, abzentrifugiert und anschließend in frischem Medium resuspendiert.

#### 3.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurde ein Volumen Zellsuspension mit einem Volumen einer 0,2%-igen Trypanblaulösung gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen im Mikroskop blau.

#### 3.2.1.4 Transfektion

Die Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA, Anti-miRNA oder Pre-miRNA wurde mit Hilfe von Lipofektamin<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen) durchgeführt. Die Zellen wurden über Nacht in 6- oder 96-Well-Platten bis zu einer Dichte von ca. 70% kultiviert. Die Transfektion erfolgte in

serumfreiem Medium nach Angaben des Herstellers. Bei jedem Ansatz erfolgte auch eine sogenannte Mock- oder Scramble-Transfektion.

#### 3.2.1.5 MTT-Assay

Die Konversion des Substrats MTT durch eine mitochondriale Dehydrogenase dient als Maß für den Metabolismus und die Vitalität von Zellen<sup>173</sup>. Durch die enzymatische Umsetzung entsteht ein Formazan-Produkt, das durch Messung der optischen Dichte quantifiziert wird. Die Transfektion wurde im 96-Well-Maßstab durchgeführt. Zur Messung der MTT-Konversion wurde den Zellen je 10 µl/Loch MTT-Reagenz zugegeben. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurden die gebildeten Farbkristalle in 200 µl/Loch einer Detergenzlösung komplett lysiert und anschließend die optische Dichte (OD) bei 550 nm in einem ELISA-Gerät gemessen und um den Wert bei 630 nm korrigiert. Als Nullwert wurde die OD aller Reagenzien ohne Zugabe von Zellen bestimmt und von allen Messwerten abgezogen. Der Vergleich erfolgte zwischen den miRNA-transfizierten Zellen und parallel dazu durchgeführten Mock-Transfektionen.

#### 3.2.1.6 Dual-Luciferase-Reporter-Assay

Für die Validierung von miRNA-Zielgen-Interaktionen wurde das Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System der Firma Promega verwendet. Das Prinzip des Systems ist der Vergleich von Luciferaseaktivitäten zwischen Zellkulturen, die mit unterschiedlichen Komponenten transfiziert wurden. Der Vektor für die Luciferase aus dem Organismus *Photinus pyralis* (Firefly-Luciferase) wurde dahingehend verändert, dass er die Zielsequenz für eine bestimmte miRNA enthielt. Dieser wurde zusammen mit dem Vektor der die Luciferase aus dem Organismus *Renilla reformis* trägt (dient der Bestimmung der Transfektionseffizienz) und dem miRNA-Duplex, die als Interaktionspartner für die klonierte Zielsequenz vorhergesagt wurde, cotransfiziert. Dieser Ansatz sollte mit einer Transfektion verglichen werden, die ebenso die beiden Vektoren enthielt, jedoch keinen miRNA-Duplex. Die Transfektionen wurden im 6-Well-Maßstab durchgeführt. Die Ernte erfolgte 48 h nach der Transfektion, indem die Zellen zweimal mit 1×PBS gewaschen wurden und anschließend mit 150 µl passivem Lysispuffer aus dem System 15 min bei RT geschüttelt wurden. Der Ansatz wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert und erneut für 15 min bei RT geschüttelt. Die Proben wurden anschließend in ein Eppendorf-Gefäß überführt und der Zelldebris durch Zentrifugation für

30 sec bei 10000×g sedimentiert. Die Messung der Firefly-Luciferase-Aktivität erfolgte, indem man zu 10 µl der Proteinsuspension 50 µl LAR II-Lösung gab und die *relative light units* (RLUs) im Luminometer mit einer Messdauer von 10 sec bestimmte. Anschließend gab man zu diesem Ansatz 50 µl Stop & Glo-Lösung und ermittelte die RLUs, und somit die Aktivität der Renilla-Luciferase, ebenfalls mit einer Messdauer von 10 sec. Diese Werte wurden in Verhältnis zueinander gesetzt und mit der Negativkontrolle verglichen.

### 3.2.2 Bakterienkultur

#### 3.2.2.1 Kultivierung und Aufbewahrung

*E. coli*-Stämme wurden als Suspensionskultur in *Luria Broth*-Medium (LB) oder zur Vereinzelung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C bzw. 37°C unter aeroben Bedingungen über Nacht. Die Suspensionskulturen wurden zudem bei 200 Upm geschüttelt. Für eine Selektion auf Resistenz gegen Antibiotika wurde Ampicillin aus einem 1000-fachen Stock zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dichtgewachsenen Bakterienflüssigkultur mit 15% Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### 3.2.2.2 Transformation

Zu einem Aliquot der kompetenten Bakterien wurden ca. 50 ng eines Ligationsansatzes bzw. 1 ng Plasmid-DNA pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschockschritt bei 42°C für 30 sec. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium und einer einstündigen Anzucht bei 37°C wurde die Zellsuspension auf Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C bzw. 30°C inkubiert.

### 3.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.3.1 Handhabung von Nukleinsäuren

Die Handhabung von Nukleinsäuren nach Standardmethoden erfolgte in Anlehnung an Sambrook *et al.* <sup>174</sup>. Restriktionsenzyme sowie DNA-modifizierende Enzyme wurden nach den Empfehlungen der jeweiligen Hersteller eingesetzt.

### 3.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Als Maß für die Reinheit der DNA diente der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNA sollte dieser Wert bei ca. 1,8 liegen. Niedrigere Werte deuten Verunreinigungen durch Proteine, höhere Werte Verunreinigungen durch Salze und Zucker an.

### 3.2.3.3 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 3.2.3.3.1 Isolierung von chromosomaler DNA

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus humanen Zelllinien wurde das QIAamp DNA Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Die Präparation erfolgt durch den Einsatz einer Silika-Matrix im Membran-Format zur selektiven Bindung von Nukleinsäuren.

#### 3.2.3.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA

##### 3.2.3.3.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Diese Methode zur Präparation von Plasmid-DNA beruht auf dem Einsatz einer Silika-Matrix im Membran-Format zur selektiven Bindung von Nukleinsäuren.

##### 3.2.3.3.2.2 Maxipräparationen von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Diese Präparationsmethode beruht auf dem Einsatz von Anionenaustauscher-Chromatographie. Darüber hinaus erfolgt eine zusätzliche Entfernung von Lipopolysacchariden (Endotoxinen), die bei einer anschließenden Transfektion von Säugerzellen deren Stoffwechselforgänge negativ beeinflussen können.

#### 3.2.3.3.3 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus humane Zelllinien erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Dabei werden die zellulären RNasen durch das starke Denaturierungsmittel Guanidinthiocyanat inaktiviert und die RNA anschließend an eine Silika-Membran selektiv gebunden.

#### 3.2.3.3.4 Isolierung von miRNA

##### 3.2.3.3.4.1 Isolierung aus konserviertem Material

Die Gesamt-RNA (inklusive miRNA) aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe wurde mit dem RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit der Firma Ambion nach Angaben des Herstellers isoliert. Dabei wird die RNA an eine Silika-Membran gebunden. Durch einen hohen Ethanol-Gehalt in den Waschpuffern bleiben die miRNAs an der Membran gebunden und können, zusammen mit der restlichen RNA, abschließend eluiert werden.

##### 3.2.3.3.4.2 Isolierung aus frischem Material

Zur Isolierung von Gesamt-RNA (inklusive miRNA) aus Zellkultur-Zellen wurde das mirVana™ miRNA Isolation Kit der Firma Ambion nach Herstellerangaben genutzt. Diese Methode beruht auf einer Phenol-Chloroform-Extraktion und einer anschließenden RNA-Aufreinigung mittels Silika-Matrix in Membran-Format.

#### 3.2.3.4 *Restriktionsverdau von DNA*

DNA wurde mit Enzymen der Firmen Roche und NEB gemäß den Angaben der Hersteller in den entsprechenden mitgelieferten Puffern bei einer Enzymkonzentration von ca. 2-3 U pro  $\mu\text{g}$  DNA verdaut. Für Plasmid-DNA erwiesen sich Inkubationszeiten von ein bis drei Stunden in der Regel als ausreichend, PCR-Produkte wurden über Nacht verdaut. Alle Ansätze wurden bei 37°C inkubiert. Sollte Plasmid-DNA anschließend für eine Ligation weiterverwendet werden, erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 15 min.

#### *3.2.3.5 Dephosphorylierung von DNA*

Die Dephosphorylierung der Vektor-DNA erfolgte mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (SAP). 50 ng verdaute DNA wurden mit 1 U SAP für 10 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend für 15 min bei 65°C inaktiviert.

#### *3.2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase*

Zur Verknüpfung von DNA-Enden wurde T4-DNA-Ligase der Firma Roche mit dem mitgelieferten Ligationspuffer verwendet. Es wurde 5 U Enzym für maximal 50 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 20 µl eingesetzt. Das Insert lag in der Regel in einem 2-5-fachen molaren Überschuss gegenüber der Plasmid-DNA vor. Der Ansatz wurde über Nacht bei 15°C inkubiert.

#### *3.2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese*

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA wurde mit Gel-Auftragspuffer geladen. Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente und betrug 1-2%. Die Elektrophorese erfolgte in 1×TAE-Puffer bei einer Spannung von bis zu 13 V/cm. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde dem Gel beim Gießen 0,5 µg/ml Ethidiumbromid beigegeben oder das Gel im Anschluss an den Laufvorgang 10 min in einer wässrigen Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt, danach 10 min gewässert.

#### *3.2.3.8 Elution von DNA aus Agarosegelen*

Zur Elution von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben benutzt. Dabei wird die Agarose durch einen chaotropen Puffer aufgelöst und die freiwerdende DNA an eine immobilisierte Glasmilch in Säulchenformat gebunden.

### 3.2.3.9 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

#### 3.2.3.9.1 Reverse Transkription von mRNA

Zur reversen Transkription von RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde stets 2,5 µg RNA eingesetzt. Diese wurde in einem 25 µl Ansatz für 10 min bei 65°C präinkubiert. Anschließend wurden 10 mM DTT, 1 mM dNTPs, 10 µM HexaN Primer, 10 µM Oligo d(T) Primer, 1 µl Superscript III Reverse Transkriptase, 1 µl RNAsin und 1× Reaktionspuffer zugegeben. Der 50 µl Ansatz wurde anschließend für 1 h bei 42°C und abschließend für 5 min bei 95°C inkubiert. Die so erhaltenen cDNA wurde bei –20°C gelagert oder direkt für die PCR verwendet.

#### 3.2.3.9.2 Reverse Transkription von miRNA

Für die reverse Transkription von miRNAs wurde das System der Firma ABI nach Herstellerangaben verwendet. Um es zu ermöglichen, dass ausschließlich reife miRNAs in cDNA umgeschrieben werden können, werden bei dieser Detektionsmethode so genannte *looped* RT-Primer eingesetzt (siehe Abb. 4). Für jede miRNA existiert dabei ein spezifischer Primer. Die Reaktion erfolgte für jeden Primer in einem separaten Ansatz unter Einsatz von 10 ng Gesamt-RNA.

Für jede 15 µl RT-Reaktion wurden 0,15 µl dNTPs, 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase, 0,19 µl RNase Inhibitor, 1,5 µl 10×Reverse Transcription Buffer, 4,16 µl nukleasefreies H<sub>2</sub>O, 3 µl Primer und 5 µl RNA zusammen gegeben. Der Ansatz wurde anschließend für 30 min bei 16°C, 30 min bei 42°C und abschließend für 5 min bei 85°C inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde entweder direkt für die PCR weiter verwendet oder bei –20°C gelagert.

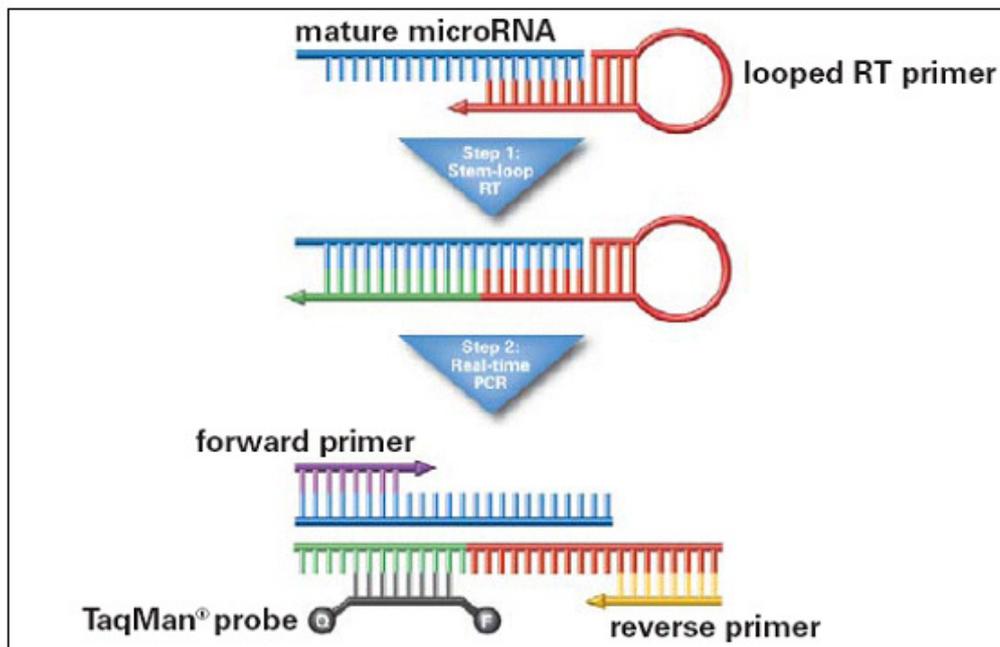


Abb. 4: Prinzip der quantitativen RT-PCR von miRNAs. Die Abbildung stammt von der Homepage der Firma ABI ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)).

### 3.2.3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 3.2.3.10.1 Amplifikation von DNA und cDNA

Es wurden sowohl das PCR Core Kit (Roche Diagnostics) als auch Ready-To-Go PCR beads (GE Healthcare) verwendet. Für einen Ansatz mit Ready-To-Go PCR beads wurden jeweils 10 pmol Primer und 200 ng DNA bzw. 3 µl cDNA zusammen gegeben und alles auf 25 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Alle PCR-Reaktionen, die mit dem PCR Core Kit durchgeführt wurden, erfolgten in einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit 1U Taq, je 10 pmol des sense und des anti-sense Primers, 1×PCR-Reaktionspuffer (inkl. MgCl<sub>2</sub> und dNTP Mix) und 200 ng DNA bzw. 3 µl cDNA. In Tab. 10 ist ein typisches PCR-Thermocyclerprogramm dargestellt.

Tab. 10: Typisches PCR-Thermocyclerprogramm

Schritt	Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [sec]
1	Initiale Denaturierung	95	120
2	Denaturierung	95	20
3	Primer-Hybridisierung	55-62	30
4	Polymerisation	72	30-90
	Wiederholung der Schritte 2-4: 35 mal		
5	Abschließende Polymerisation	72	600
6	Ende	4	∞

### 3.2.3.10.2 Quantitative RT-PCR von mRNA und miRNA

Quantitative oder Real-time-PCR (qPCR bzw. RT-PCR) bezeichnet ein PCR-Verfahren, bei dem während der PCR-Reaktion die Menge der entstandenen Produkte in Echtzeit gemessen wird. Quantitative oder Real-time-PCR wird vor allem zur Bestimmung von Genexpressionsleveln, aber auch zur Diskriminierung von Allelen und zur Quantifikation von DNA-Kopienzahlen genutzt. Die in RT-PCR-Experimenten gemessene Größe ist die Fluoreszenzintensität bei einer oder mehreren Wellenlängen. Produktabhängige Fluoreszenz entsteht entweder unspezifisch, indem dsDNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR-Green I oder Ethidiumbromid in die gebildeten Produkte interkalieren, oder spezifisch durch die Verwendung fluorophormarkierter Oligonukleotidsonden, die auf der Zielsequenz hybridisieren.

Der Schnittpunkt des gemessenen Signals mit einer Basislinie oberhalb des unspezifischen Hintergrundsignals wird als *crossing point* (Cp) bzw. *threshold cycle* (Ct) bezeichnet. Der Ct/Cp wird in der Anzahl der PCR-Zyklen angegeben. Mit der LightCycler-Software (Roche Diagnostics) wurde über den *second derivate maximum* Analysemodus eine vollständige automatisierte Quantifizierung durchgeführt. Hierbei ist der Ct/Cp definiert als die Anzahl von PCR-Zyklen, bei der Fluoreszenzzunahme aus dem linearen in den exponentiellen Bereich wechselt. Mathematisch entspricht dieser Wendepunkt dem Maximum der zweiten Ableitung der Kurve entstehend aus der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zykluszahl.

#### 3.2.3.10.2.1 Real-Time-RT-PCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden

Bei dieser Variante binden während des Annealing-Schrittes neben den sequenzspezifischen PCR-Primern auch die sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden an die denaturierte Zielsequenz. Dabei erhält man bei der Verwendung von TaqMan-Sonden zunächst kein Fluores-

zenzsignal, da der Quencher die Fluoreszenzemission des Reporters unterdrückt<sup>175</sup>. Während der Synthese des Zweitstranges erreicht die Taq-DNA-Polymerase die Sonde. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Fluoreszenzsonde hydrolytisch gespalten, sodass Quencher und Reporter getrennt werden. Eine Anregung des Reporters führt dann zur Emission einer Fluoreszenz definierter Wellenlänge, die messtechnisch erfasst werden kann. Die während der Synthese gemessene Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge und damit proportional zur Menge an Ausgangs-RNA.

Einen Sonderfall der sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden stellt die *Universal ProbeLibrary* (UPL) der Firma Roche Diagnostics dar. Sie basiert auf nur 165 kurzen Hydrolyse-Sonden, die eine Länge von jeweils 8 bis 9 bp haben. Um trotz dieser Kürze die entsprechend hohen Schmelztemperaturen zu erreichen, werden in diese Sonden so genannte *Locked Nucleic Acids* (LNA) eingebaut. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Nukleinsäuren, die eine deutlich höhere Schmelztemperatur im Vergleich zu unmodifizierten Nukleinsäuren besitzen. Die Kürze der Sonden macht es wahrscheinlich, dass die entsprechende Sequenz in regelmäßiger Verteilung über das gesamte Transkriptom vorliegt. Mit den 165 Sonden der UPL ist es möglich annähernd 100% aller Transkripte zu detektieren.

Die optimale Primer-Sonden-Kombination, zur Detektion des gewünschten Transkripts, wurde mit Hilfe des *Universal ProbeLibrary Assay Design Center*, welches von der Firma Roche zur Verfügung gestellt wird, zusammengestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass Intron-überspannende Primerpaare genutzt wurden, damit ausschließlich die cDNA quantitativ erfasst wird. Die Ansätze wurden immer als Doppelbestimmung (Technisches Replikat) durchgeführt um Pipettierfehler und andere Schwankungen zu minimieren. Der verwendete Standardansatz sah folgendermaßen aus: 8 µl TaqMan Master Mix, je 4 µl Primer (20 pmol), 0,4 µl Sonde, 22,6 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl Template (Standard RT-Ansatz, siehe 3.2.3.9.1). Von diesen 40 µl sind je 20 µl in eine für den LightCycler vorgesehene Glaskapillare gegeben worden. LightCycler PCRs wurden nach folgendem Standard-Programm durchgeführt. Während einer initialen Denaturierung von 95°C für 10 min wurde die Polymerase aktiviert. Es schlossen sich 45 Zyklen mit 10 sec Denaturierung bei 95°C, 20-40 sec Annealing bei 59°C und 1 sec Elongation bei 72°C. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte in jedem Zyklus während des Extensionsschrittes. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte gegenüber einem internen Standard (humanes PBGD). Es wurden generell Ansätze von drei biologischen mit je

zwei technischen Replikaten gemessen. Zur Berechnung der normalisierten Transkriptmenge von transfizierten und untransfizierten Zellen wurde folgende Formel verwendet:

$$\Delta Ct = Ct(\text{Gen A in Zellkultur X}) - Ct(\text{Gen N in Zellkultur X})$$

Die  $\Delta Ct$ -Werte (*certain threshold level*) wurden so aus den Messungen für PBGD (Gen N) und das zu untersuchende Gen (Gen A) ermittelt. Die drei Messwerte für die untransfizierten Zellen wurden gemittelt und nach folgender Formel in relative Transkriptmenge (X) umgerechnet:  $X = 2^{-\Delta Ct}$

Die relativen Transkriptmengen der transfizierten Zellen wurden anschließend durch die Werte der untransfizierten Zellen geteilt und so zueinander in Verhältnis gesetzt.

### 3.2.3.10.2.1.1 Standardkurven

Die Standardkurven wurden aus einer Verdünnungsreihe, entstanden durch logarithmische Verdünnung eines cDNA-Pools, hergestellt. Da die genaue Konzentration des Gens im cDNA-Pool unbekannt war, wurden sie als RNA-Äquivalent angegeben. Hierbei wird die in der Verdünnung eingesetzte cDNA als Konzentration an RNA angegeben, aus der sie hervorgegangen ist. Die Verdünnung erfolgte ausgehend von 2 ng/μl RNA-Äquivalent in vier logarithmischen Schritten. Der Ct-Wert ist umgekehrt proportional zur Ausgangsmenge an DNA. Durch die Auftragung der gemessenen Ct-Werte gegen die logarithmisch verdünnt RNA-Äquivalente lässt sich eine Gerade ziehen. Aus der Steigung dieser Standardkurve wird die Effizienz der PCR berechnet:  $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ . Die Standardkurve selber ergibt die Gleichung:

$$Ct = -\left[\frac{1}{\log E}\right] \times \log T_0 + \left[\frac{\log T}{\log E}\right]$$

$T_0$  bezeichnet die Ausgangskonzentration des Gens und T die Konzentration des PCR-Produktes am Ct. Mit Hilfe dieser Gleichung wurde die Ausgangskonzentration  $T_0$  eines Gens als RNA-Äquivalent von unbekanntenen Proben durch die LightCycler-Software automatisch berechnet.

#### 3.2.3.10.2.1.2 Kalibrierung

In dieser Arbeit erfolgte eine relative Quantifizierung. Bei dieser Methode ist die absolute Ausgangskonzentration des Zielgens unbekannt. Die normalisierten RNA-Äquivalente der Proben werden im Verhältnis zu einem Kalibrator gesetzt. Der Kalibrator soll das Zielgen stabil in gleicher Höhe exprimieren. Mit ihm sind auch Vergleiche zwischen einzelnen Light-Cycler-Läufen möglich.

#### 3.2.3.10.2.2 Real-Time-RT-PCR von miRNA

Die Real-Time Quantifizierung von miRNAs erfolgte mit dem System von ABI nach Herstellerangaben. Dieses System basiert auf dem TaqMan-Prinzip und enthält einen miRNA-spezifischen sense Primer, einen spezifischen antisense Primer und eine miRNA-spezifische TaqMan MGB-Sonde. Die TaqMan MGB-Sonde besteht aus einem Reporterfarbstoff (FAM) am 5'-Ende, einem *minor groove binder* (MGB) am 3'-Ende und einen nicht-fluoreszierenden Quencher am 3'-Ende.

Für eine 20 µl-Reaktion wurden 1,33 µl RT-Produkt, 1 µl TaqMan MicroRNA Assay, 10 µl TaqMan 2× Universal PCR Master Mix und 7,67 µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O zusammen gegeben. Das Standard-Programm bestand aus einer Enzymaktivierung für 10 min bei 95°C, einer Denaturierung für 15 sec bei 95°C und einem Annealing- und Extinktionsschritt für 60 sec bei 60°C. Auf dem LightCycler 480 erfolgten dabei 45, auf dem 7900HT Fast Real Time PCR System 40 Zyklen.

##### 3.2.3.10.2.2.1 Normalisierung von Ct-Werten

Aus den Ct-Werten einer ubiquitär exprimierten miRNA (miR-16 oder U6) wurde der Mittelwert ermittelt und die Differenz zum Wert der jeweiligen Einzelmessung bestimmt. Diese Differenz wurde anschließend vom Ct-Wert der Einzelmessung der zu untersuchenden miRNA abgezogen (bei positiver Differenz) oder zugerechnet (bei negativer Differenz).

### 3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.4.1 Proteinextraktion aus Zellkulturzellen

Die Transfektionen wurden im 6-Well-Maßstab durchgeführt. Die Ernte erfolgte, indem die Zellen zweimal mit 1×PBS gewaschen, abgeschabt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt wurden. Dann wurden sie für 10 min bei RT und 8000×g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in 100 µl 8 M Urea resuspendiert, gevortext und dann 15 min bei 95°C unter Schütteln inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend bei 10000×g (RT) für 1 min pelletiert. Der Überstand wurde weiter im Western Blot analysiert. Erfolgte dies nicht direkt, wurden die Proben bei –20°C gelagert und vor der SDS-PAGE ein weiteres Mal für 10 min bei 95°C inkubiert und anschließend für 1 min bei 10000×g zentrifugiert.

#### 3.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Test)

Die Messung der Proteinkonzentration in einer Lösung erfolgte mittels BCA Protein Assay Kit (Pierce) nach Herstellerangaben. Dieser Test basiert auf der Komplex-Bildung von Proteinen mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischen Lösungen (Biuret-Reaktion). Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen des Komplexes werden zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert, die mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die photometrische Messung erfolgte in einem ELISA-Reader bei 562 nm und wurde gegen Eichlösung durchgeführt.

#### 3.2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen und Coomassie-Färbung

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Konzentrationen über eine diskontinuierliche Elektrophorese mit separat gegossenen Sammel- und Trenngelen nach Laemmli<sup>164</sup>. Das Protein wurde 1:4 mit 4× Laemmli-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert, der Überstand für die Elektrophorese verwendet. Die Elektrophorese verlief bei 200 V. Der direkte Nachweis der Proteine im Gel oder auf der Membran erfolgte durch das Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue und ein schrittweises Entfärben in Entfärbelösung.

#### 3.2.4.4 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot) und Immundetektion

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden elektrisch mit Hilfe einer Wet-Blotting Apparatur auf PVDF übertragen. Dazu wurde das SDS-Gel mit einer zuvor in Methanol äquilibrierten Membran in die Blotting-Apparatur platziert. Der Transfer erfolgte entweder für 2 h bei einer Stromstärke von 135 mA und RT oder über Nacht bei 20 mA und 4°C. Die Größe der Proteine und der Erfolg des Transfers konnte mit Hilfe eines vorgefärbten Proteingrößenstandards verfolgt werden. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h in Blockreagenz abgesättigt. Anschließend wurde der erste Antikörper nach Bedarf in Blockreagenz verdünnt und die Membran darin unter Schütteln über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde dann 3 × 5 min in 1×TBST gewaschen, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Nun wurde der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper, entsprechend verdünnt, für eine Stunde bei RT und unter Schütteln auf die Membran gegeben. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase oxidiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid das Substrat Luminol, dabei wird Licht emittiert. Wiederum wurde die Membran 3 × 5 min in 1×TBST gewaschen. Der Nachweis erfolgte mit dem Western Lightning<sup>TM</sup> Chemiluminescence Reagent (Perkin-Elmer). Die Membran wurde dazu 1 min mit Substrat inkubiert, kurz abgetropft und auf einem Röntgenfilm exponiert. Je nach Intensität der Reaktion konnte der ECL-Film 30 sec bis zu einer halben Stunde belichtet werden. Die Entwicklung und Fixierung des Films erfolgte mit dem Kodak *x-ray Developer* und *Fixer*.

#### 3.2.4.5 Immunblot-Stripping

Um eine Membran mit einem weiteren Primärantikörper inkubieren zu können, müssen zuvor gebundene Antikörper von der Membran entfernt werden. Dazu wurde diese eine Stunde bei 37°C in Stripping-Lösung inkubiert. Bevor eine erneute Immundetektion durchgeführt werden konnte, erfolgte eine erneute Absättigung mit Blockreagenz für eine Stunde.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 MiRNA-Expressionsprofile von DLBCLs und FLs

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass miRNAs zur Klassifizierung von Tumorentitäten geeignet sind<sup>121</sup>. Zum Teil ist damit sogar eine präzisere Unterteilung möglich als mit „klassischen“ Methoden wie der Immunhistochemie oder der Detektion von mRNA-Expressionen. Aus diesem Grund sollten im ersten Teil dieser Arbeit diese Vorteile genutzt werden und die Expression von miRNAs in 58 DLBCL- und 46 FL-Fällen ermittelt werden. Für jeden Fall wurde dazu der Expressionsstatus von 157 miRNAs untersucht. Die Ergebnisse aller Expressionswerte einer einzelnen Gewebeprobe wurden als miRNA-Expressionsprofil bezeichnet. Um einen Vergleich mit Normalgewebe zu ermöglichen, wurden zusätzlich von sieben reaktiven Lymphknoten ebenfalls die Expressionslevel dieser 157 miRNAs analysiert.

Für den Nachweis von miRNA-Expressionen in bestimmten Zellen stehen, wie auch bei der Messung von mRNAs, zwei verschiedene Methoden zur Wahl: Microarrays oder quantitative RT-PCRs. Die erste Variante hat den Vorteil, dass mit einem relativ geringen Aufwand eine große Zahl von miRNAs auf ihren Expressionsstatus hin untersucht werden können. Problematisch sind die relativ schlechte Reproduzierbarkeit, die geringe Aussagekraft bezüglich der genauen Expressionsstärke und Schwierigkeiten bei der Detektion von ausschließlich reifen miRNAs. Ein direkter Vergleich zwischen mehreren Proben ist dadurch nur in begrenztem Maße möglich. Die zweite Variante, die quantitative RT-PCR, hat den großen Vorteil, sehr genaue und reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Dadurch sind direkte Vergleiche und Aussagen über Expressionslevel möglich. Nachteile dieser Methode sind der relativ große technische und finanzielle Aufwand.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, hinsichtlich des Nachweises von miRNA-Expressionen, erfolgten mittels quantitativen RT-PCRs. Dazu wurde das System der Firma Applied Biosystems genutzt (siehe Abb. 4). Dabei erfolgt in einem ersten Schritt die cDNA-Synthese mittels miRNA-spezifischen *looped* RT-Primern. Diese Primer sorgen dafür, dass nur reife miRNAs umgeschrieben werden und sind der erste Schritt zur Gewährleistung der Spezifität der einzelnen Reaktionen. Für jede miRNA existiert ein spezieller *looped* RT-Primer, es wurden dementsprechend 157 parallele Reaktionen für jede Probe durchgeführt. Die anschließenden Real-Time Quantifizierungen erfolgten ebenfalls für jede miRNA einzeln; es fanden also 157 Einzelreaktionen statt. Das System basiert auf dem bekannten TaqMan-Prinzip mit einem miRNA-spezifischen sense Primer, einem spezifischen antisense Primer

---

und einer miRNA-spezifischen TaqMan MGB-Sonde (*minor groove binder*). Dadurch wird auch in diesem zweiten Schritt gewährleistet, dass jeweils nur eine spezielle miRNA amplifiziert wird. Die so gewonnenen Ct-Werte mehrerer Proben konnten anschließend miteinander verglichen und auf Unterschiede in den Expressionsleveln hin untersucht werden.

#### 4.1.1 Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von DLBCLs und Normalgewebe

In einem ersten Ansatz wurden von den 157 untersuchten miRNAs die Expressionslevel in den DLBCL-Fälle erstellt und mit den Werten der reaktiven Lymphknoten verglichen. Anschließend wurden die Daten auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Dazu erfolgten Expressionsanalysen sowohl auf globaler Profilebene als auch für jede einzelne miRNA mittels *Welsh two-samples t-test*. Die Vielfältigkeit der einzelnen Proben wurde durch eine *False Discovery Rate* (FDR) korrigiert. MiRNAs mit einer FDR < 0,05 und einem  $\Delta Ct \geq 1,5$  wurden als differentiell exprimiert bezeichnet.

Beim Vergleich von Expressionsleveln der 58 DLBCL-Fälle mit den sieben Lymphknoten zeigten 15 miRNAs eine differentielle Expression (siehe Abb. 5). Vier dieser miRNAs (miR-210, miR-155, miR-106a und miR-17-5p) waren signifikant stärker in DLBCLs als im Normalgewebe exprimiert. Die restlichen elf miRNAs (miR-150, miR145, miR-328, miR-139, miR-99a, miR-10a, miR-95, miR-149, miR-320, miR-151 und let-7e) zeigten dagegen ein signifikant geringeres Expressionslevel in DLBCLs als in Lymphknoten. Mit einem Unterschied von jeweils dem ~7-fachen gegenüber dem Lymphknoten war die Expression von miR-210 am stärksten erhöht, die von miR-150 am stärksten verringert.

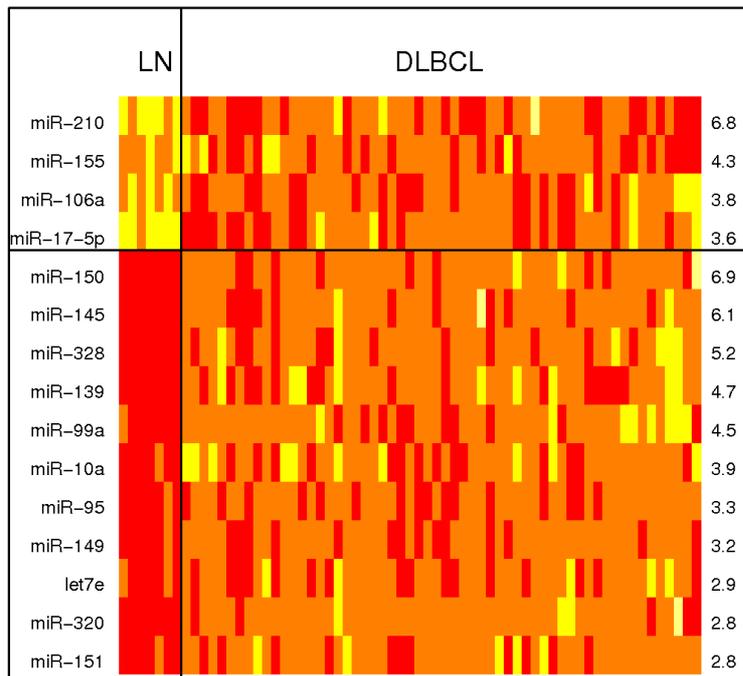


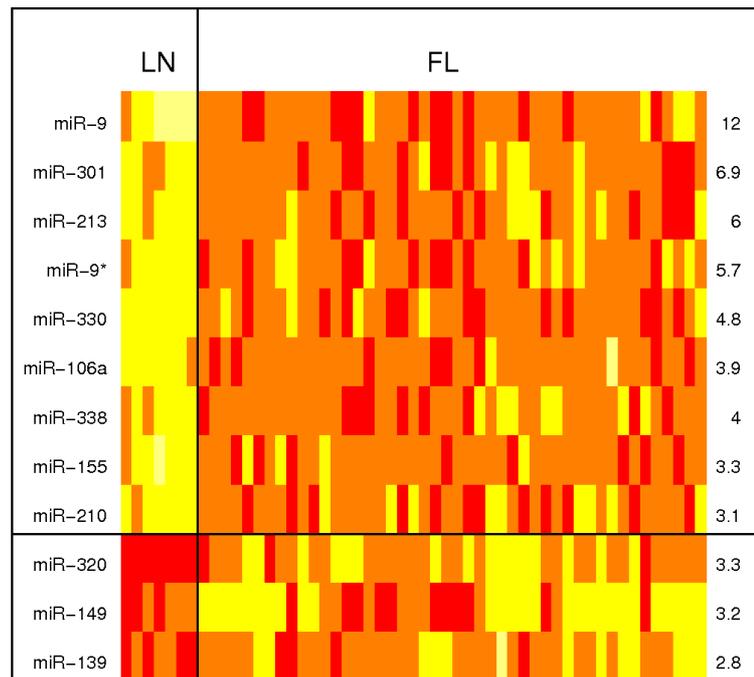
Abb. 5: Differentiell exprimierte miRNAs beim Vergleich DLBCLs vs Lymphknoten (LN). Waagerecht sind die signifikant dysregulierten miRNAs aufgeführt, senkrecht die untersuchten DLBCL-Fälle und Lymphknoten. In der rechten Spalte ist der durchschnittliche Unterschied (n-fach) der jeweiligen miRNA angegeben. In der oberen Hälfte sind die miRNAs aufgetragen, die stärker in DLBCLs exprimiert sind, in der unteren Hälfte die, die geringer exprimiert sind. Die rote Farbcodierung bezeichnet ein hohes Expressionslevel, die gelbe ein niedriges Expressionslevel.

#### 4.1.2 Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von FLs und Normalgewebe

In einem nächsten Ansatz wurden die miRNA-Expressionslevel von 46 FLs mit denen der sieben reaktiven Lymphknoten verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie im obigen Test (siehe 4.1.1).

Der Vergleich der FLs mit den Lymphknoten ergab zwölf differentiell exprimierte miRNAs (siehe Abb. 6). Neun (miR-9, miR-301, miR-213, miR-9\*, miR-330, miR-106a, miR-338, miR-155 und miR-210) von ihnen zeigten eine signifikante Heraufregulation in den untersuchten Lymphomproben. Drei miRNAs (miR-320, miR-149 und miR-139) zeigten dagegen ein geringeres Expressionslevel. Die deutlichsten Unterschiede zwischen malignem und nicht-malignem Gewebe wurden für die miR-9, mit einer 12-fach höheren, bzw. für die miR-320, mit einer 3,3-fach geringeren Expression in den Lymphomen, nachgewiesen.

Abb. 6: Differentiell exprimierte miRNAs beim Vergleich FLs vs ten (LN). Waagerecht sind die signifikant dysregulierten miRNAs aufgeführt, senkrecht die untersuchten FL-Fälle und Lymphknoten. In der rechten Spalte ist der durchschnittliche Unterschied (n-fach) der jeweiligen miRNA angegeben. In der oberen Hälfte sind die miRNAs aufgetragen, die stärker in FLs exprimiert sind, in der unteren Hälfte die, die geringer exprimiert sind. Die rote Farbcodierung bedeutet ein hohes Expressionslevel, die gelbe ein niedriges Expressionslevel.



#### 4.1.3 Vergleich von miRNA-Signaturen der beiden Lymphomentitäten DLBCLs und FLs

Auch ein Vergleich der beiden Lymphomentitäten miteinander wurde durchgeführt. Die statistische Auswertung fand wiederum nach dem beschriebenen Prinzip statt (siehe 4.1.1). Dabei fanden sich zehn differentiel exprimerte miRNAs zwischen DLBCLs und FLs (siehe Abb. 7). Zwei davon (miR-17-5p und miR-92) waren in DLBCLs überexprimiert, acht (miR-330, miR338, miR-135a, miR-150, miR-125b, miR-301, miR-126 und miR-213) dagegen in FLs. Auffallend war, dass die Unterschiede der miRNA-Expressionssignaturen zwischen der beiden Entitäten bei weitem nicht so groß waren, wie dies beim Vergleich Lymphom vs Lymphknoten der Fall war (siehe 4.1.1 und 4.1.2). Den größten Unterschied zeigte die miR-330 mit einer 4,8-fach stärkeren Expression in FLs im Vergleich zu DLBCLs.

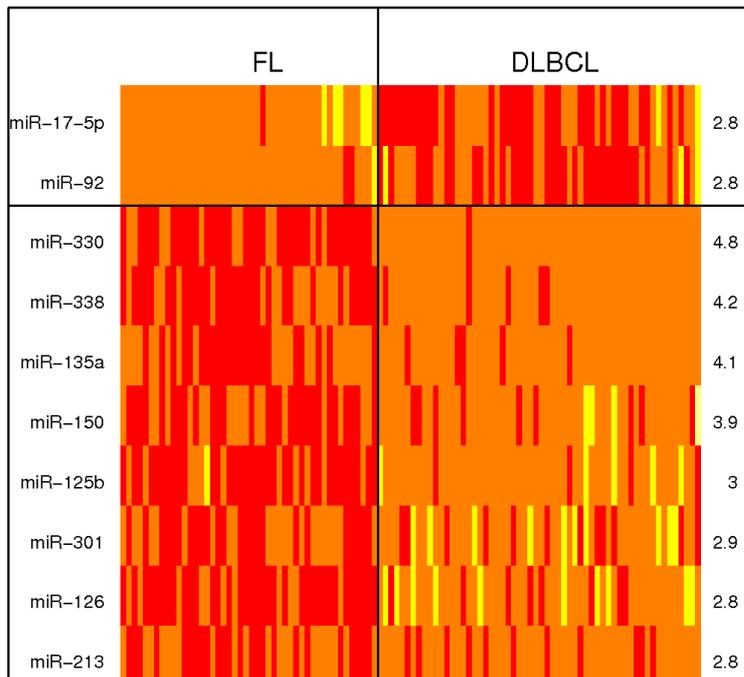


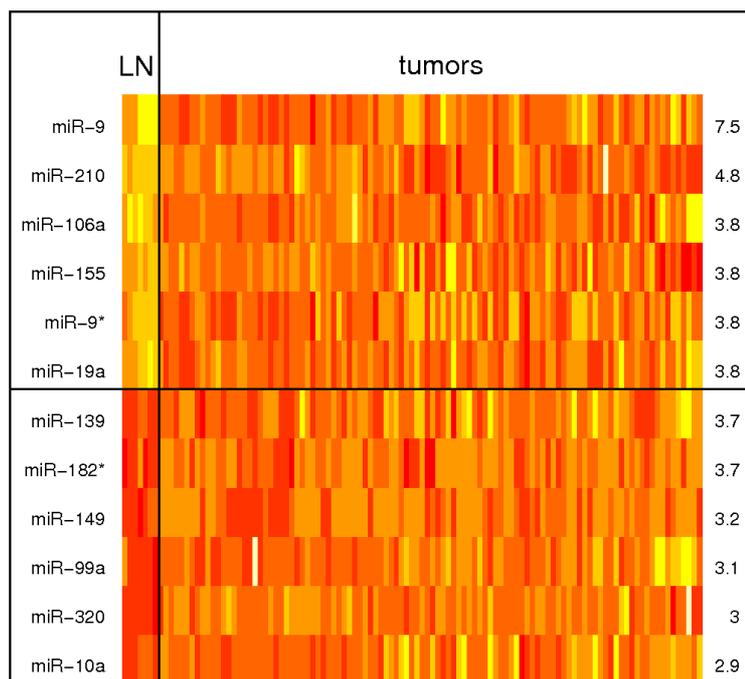
Abb. 7: Differenziell exprimierte miRNAs beim Vergleich FLs vs DLBCLs. Waagerecht sind die signifikant dysregulierten miRNAs aufgeführt, senkrecht die untersuchten FL- und DLBCL-Fälle. In der rechten Spalte ist der durchschnittliche Unterschied der jeweiligen miRNA (n-fach) angegeben. In der oberen Hälfte sind die miRNAs aufgetragen, die stärker in DLBCLs exprimiert sind, in der unteren Hälfte die, die geringer exprimiert sind. Die rote Farbcodierung bedeutet ein hohes Expressionslevel, die gelbe ein niedriges Expressionslevel.

#### 4.1.4 MiRNAs mit einem Einfluss auf die Entwicklung von Lymphomen

Um miRNAs zu finden, die eine generelle Rolle in der Entwicklung von Lymphomen haben, wurden von den erstellten Expressionsprofilen die 20 miRNAs mit den größten Unterschieden zwischen DLBCLs und FLs entfernt. Anschließend wurden die Fälle der beiden Entitäten zu einer neuen Gruppe zusammengefasst, die als Lymphome bezeichnet wurde. Diese Gruppe wurde gegen die Gruppe von reaktiven Lymphknoten verglichen und es folgte eine statistische Auswertung wie oben (siehe 4.1.1) nach differenziell exprimierten miRNAs innerhalb der verbliebenen 137.

Eine Liste von zwölf miRNAs zeigte eine signifikante Dysregulation zwischen neoplastischen und gesunden Geweben (siehe Abb. 8). Sechs miRNAs (miR-9, miR-210, miR-106a, miR-155, miR-9\* und miR-19a) waren dabei stärker und sechs miRNAs (miR-139, miR-182\*, miR-149, miR-99a, miR-320 und miR-10a) geringer in den Lymphomen exprimiert. Den größten Unterschied zwischen beiden Gruppen wurde für miR-9 nachgewiesen. Sie war um das 7,5-fache stärker in den untersuchten Lymphomen, im Vergleich zu den Lymphknoten, exprimiert.

Abb. 8: Differenziell exprimierte miRNAs beim Vergleich Lymphome (tumors) vs Lymphknoten (LN). Waagrecht sind die signifikant dysregulierten miRNAs aufgeführt, senkrecht die untersuchten Lymphom-Fälle und Lymphknoten. In der rechten Spalte ist der durchschnittliche Unterschied (n-fach) der jeweiligen miRNA angegeben. In der oberen Hälfte sind die miRNAs aufgetragen, die stärker in den Lymphomen exprimiert sind, in der unteren Hälfte die, die geringer exprimiert sind. Die rote Farbcodierung bedeutet ein hohes Expressionslevel, die gelbe ein niedriges Expressionslevel.



#### 4.1.5 Vergleich der miRNA-Expressionssignaturen von GCB- und non-GCB-Untergruppen innerhalb der DLBCLs

Um zu testen, ob eine Unterteilung der DLBCLs in die Subgruppen GCB- und non-GCB, wie es durch Immunhistochemie und mRNA-Expression möglich ist, auch mittels einzelner miRNAs erfolgen kann, wurden die, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, Fälle in die beiden Gruppen aufgeteilt. Dies erfolgte nach dem Algorithmus von Hans *et al.*, bei dem die immunhistochemischen Färbungen von CD10, BCL6 und MUM1 ausgewertet werden<sup>248</sup>. Jeweils 25 Fälle konnten den beiden Gruppen zugeordnet werden, die restlichen acht wurden von den weiteren Analysen ausgenommen.

Durch eine Hauptkomponentenanalyse der miRNA-Expressionslevel konnten separate Gruppen für Lymphknoten, FLs und DLBCLs erstellt werden. Eine Unterscheidung in GCB- und non-GCB war aber nur schwer möglich (siehe Abb. 9). Durch t-Tests sollten miRNAs herausgefiltert werden, die zwischen diesen beiden Gruppen unterscheiden (siehe Tab. 11). Es wurden neun miRNAs mit differentieller Expression identifiziert, die eine FDR von 20% haben. Bei diesen miRNAs handelte es sich um miR-27b, miR-28, miR-129, miR-133a, miR-133b, miR-138, miR-151, miR-155 und miR-199b. Eine Gruppierung in GCB und non-GCB anhand dieser miRNAs ist aber nicht eindeutig möglich.

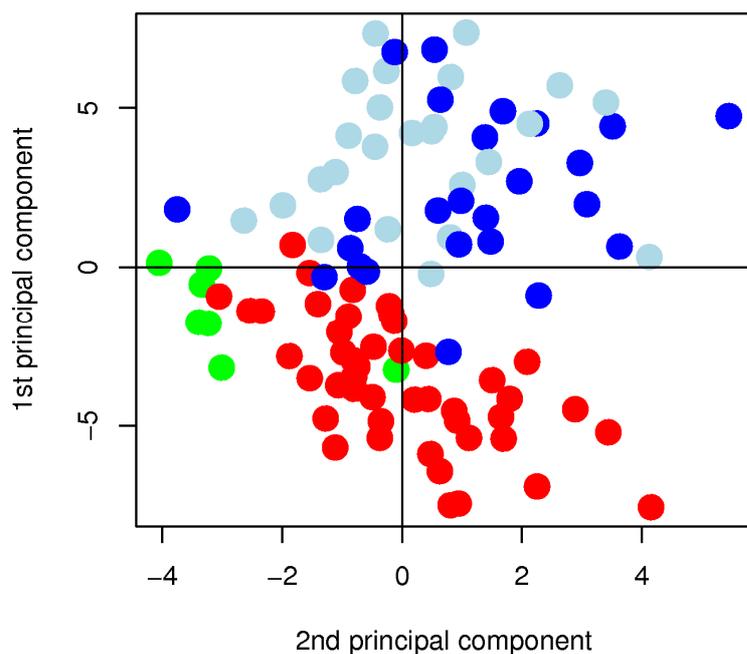


Abb. 9: Hauptkomponentenanalyse der miRNA-Expressionslevel von Lymphknoten (grün), FL (rot), GCB- (hellblau) und non-GCB- (dunkelblau) DLBCL. Eine Unterscheidung in Lymphknoten, DLBCLs und FLs ist möglich, eine Untergruppierung in GCB und non-GCB dagegen nicht.

Tab. 11: Auswertung der t-Test-Analysen für die Unterscheidung in GCB- und non-GCB. Neun miRNAs zeigen Unterschiede zwischen den beiden DLBCL-Untergruppen.

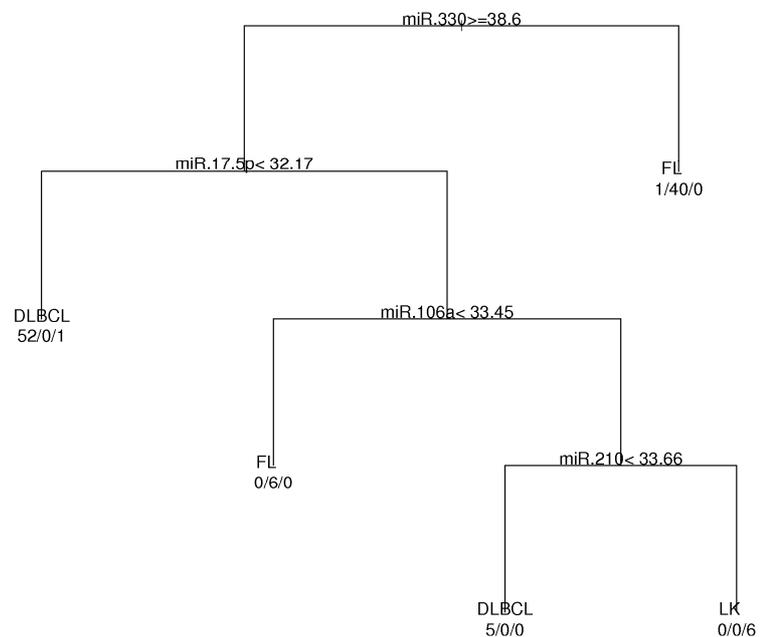
miRNA	FDR	$\Delta Ct$	KI-1	KI-2
miR-27b	0,109	-0,743	-1,277	-0,21
miR-28	0,057	-1,059	-1,721	-0,397
miR-129	0,033	-1,242	-1,907	-0,577
miR-133a	0,087	-2,218	-3,73	-0,706
miR-133b	0,17	-1,909	-3,429	-0,389
miR-138	0,114	-1,202	-2,087	-0,317
miR-151	0,021	-0,934	-1,4	-0,468
miR-155	0,181	1,272	0,228	2,317
miR-199b	0,036	-1,497	-2,355	-0,638

#### 4.1.6 MiRNAs mit diagnostischer Relevanz für DLBCLs und FLs

Als nächstes sollte herausgefunden werden, welches die minimale Anzahl an miRNAs ist, die eine korrekte Unterteilung in die Gruppen gesund vs krank, aber auch eine weitere Unterteilung in DLBCLs und FLs ermöglicht. Dazu wurde die Profile der miR-9, miR-301, miR-320, miR-149, miR-150, miR-155, miR-145, miR-330, miR-92 und miR-338 genutzt, da es sich bei diesen miRNAs um die mit den stärksten differentiellen Expressionen zwischen den drei Gruppen handelte. Der Klassifikationsbaum wurde mittels Kreuzentropie als Maß für Reinheit

der Knotenpunkte kalkuliert. Der Baum entstand durch binäre rekursive Aufteilung, für die die Ct-Werte der entsprechenden miRNAs benutzt wurden.

Abb. 10: Ein Klassifikationsbaum von DLBCL, FL und Lymphknoten identifiziert 98% aller analysierten Fälle korrekt. Die Expression von miR-330 (Ct  $\geq$  38,6) ordnet 87% aller FL in einer Gruppe zusammen. Ein DLBCL-Fall wurde falsch zu sortiert. Ähnlich läuft es mit der Expression von miR-17-5p, miR-106a und miR-210.



Für die Unterteilung in DLBCL, FL und Lymphknoten reichen vier miRNAs aus. Die Expressionslevel von miR-330, miR-17-5p, miR-106a und miR-210 führten in 98% der untersuchten Fälle zu einer korrekten Zuordnung in die entsprechende Gruppe. In einem ersten Schritt wurden 41 Fälle mit einem Ct  $\geq$  38,6 der Gruppe der FLs zugeordnet. Dabei handelte es sich um 40 FLs (87% der Patienten mit FLs) und ein DLBCL (1,7% der Patienten mit DLBCLs). Im zweiten Schritt wurden die verbleibenden Fälle mit einem Ct  $<$  32,17 für die miR-17-5p Expression der DLBCL-Gruppe zu sortiert. Dies traf auf 53 der untersuchten Fälle zu, bei denen es sich um 52 DLBCL-Patienten handelte (89,7% der Fälle) und um einen Lymphknoten (14,3% der Referenzgewebe). Nachfolgend wurden die übrigen Proben mit einem miR-106a Expressionslevel  $<$  33,45 Ct der Gruppe der FLs zugeordnet. Bei allen sechs Patientenproben, auf die dieser Ct-Wert zutraf, handelte es sich um FLs (13% der Fälle). In einem letzten Schritt wurden die restlichen elf Gewebe in die beiden Gruppen miR-210 Expression  $<$  33,66 Ct oder  $\geq$  33,66 Ct einsortiert. Sowohl die fünf DLBCL- (8,6% der Fälle) als auch die sechs Lymphknoten-Proben (85,7% der Referenzgewebe) wurden der jeweils richtigen Gruppe zugeordnet.

#### 4.1.7 MiRNAs mit prognostischer Relevanz bei DLBCLs

Abschließend sollten die Daten der miRNA-Expressionslevel von DLBCLs darauf hin untersucht werden, ob miRNAs existieren die eine prognostische Relevanz zeigen. Die Überlebensdaten von 53 Patienten waren dafür verfügbar. Von den 153 untersuchten miRNAs wurden 51 miRNAs von den weiteren Analysen ausgeschlossen, da deren Ct-Werte sich in einem Rahmen von  $\leq 3$  befanden. Der Mittelwert jeder miRNA (Gruppe 0:  $<$  Mittelwert, Gruppe 1:  $\geq$  Mittelwert; außer miR-21: Gruppe 0:  $\leq$  Mittelwert, Gruppe 1:  $>$  Mittelwert) wurde als Grenzwert angewandt. Das ereignisfreie Überleben (EFS) wurde als Zeit vom Beginn der Therapie bis zu einem weiteren Krankheitsfortschreiten, dem Beginn weiterer oder Zweittherapien, einem Rückfall oder dem Tod definiert. Das Gesamtüberleben (OS) wurde als Zeit vom Beginn der Therapie bis zum Tod definiert. Die Charakteristika der Patienten mit DLBCL-Diagnose sind in Tab. 12 zusammengefasst. Die mittlere Alter betrug 63 Jahre, mit 3- und 5-Jahres-Überlebensraten von 71,2% und 66,9%. Der mittlere Beobachtungszeitraum lag bei 72 Monaten.

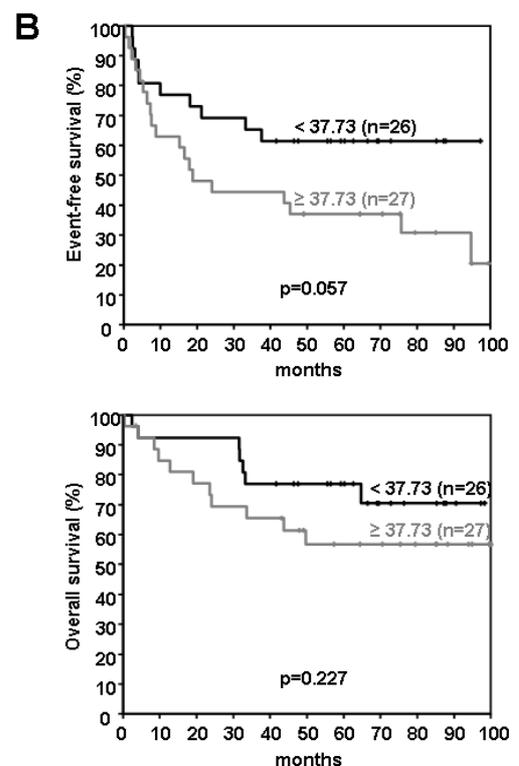
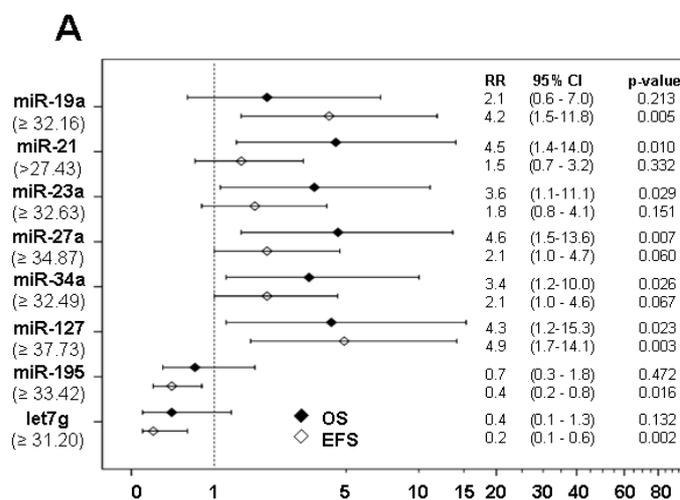


Abb. 11: Die Expressionslevel von acht miRNAs sind mit dem ereignisfreien und/oder Gesamtüberleben korreliert. (A) In einer multivariaten Analyse zeigt ein geringes miR-127-Expressionslevel eine signifikant schlechtere Prognose für EFS und OS. Geringe Expressionslevel von miR-21, miR-23a, miR-27a und miR-34a korrelieren mit einem schlechten OS. Geringe miR-19a-Expressionslevel korrelieren mit einem schlechten EFS, währenddessen miR-195 und let-7g einen umgekehrten Effekt auf das EFS haben. (B) Kaplan-Meier-Kurven der miR-127 nach einer univariaten Analyse.

Die Beziehung zwischen der Expression einer einzelnen miRNAs und der Überlebensprognose wurde mittels einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse untersucht. Dabei wurden die Faktoren des *International Prognostic Index* (IPI) mit einbezogen. MiRNAs mit einem Signifikanzlevel von  $P < 0,1$  für EFS oder OS in einer univariaten Analyse (EFS: miR-19a, miR-29a, miR-92, miR-127, miR-195, miR-222, let-7g; OS: miR-21, miR-23a, miR-27a, miR-142-5p, miR-182\*, miR-296; beide: miR-34a, miR-125a, miR-186) wurden für nachfolgende multivariate Analysen benutzt. Basierend auf diesen, wurden acht miRNAs (miR-19a, miR-21, miR-23a, miR-27a, miR-34a, miR-127, miR-195 und let-7g) mit einem P-Wert  $< 0,05$  für EFS oder OS identifiziert (siehe Abb. 11). Die miR-127 hatte als Einzige einen signifikanten Einfluss sowohl auf das EFS als auch auf das OS. So zeigten Patienten mit einer geringen miR-127-Expression ( $Ct \geq 37,73$ ) in einer multivariaten Analyse eine schlechte Prognose für OS (RR = 4,3, 95% CI, 1,2-15,3,  $P = 0,023$ ) und EFS (RR = 4,9, 95% CI, 1,7-14,1,  $P = 0,003$ ). Für die verbleibenden sieben miRNAs konnte eine signifikante Korrelation entweder für EFS oder OS nachgewiesen werden. Patienten mit herab regulierten miR-21, miR-23a, miR-27a und miR-34a Expressionsleveln hatten ein schlechtes OS. Im Gegensatz dazu wurde das EFS durch niedrige Expressionslevel von miR-19a (kürzeres EFS), miR-195 und let-7g (längeres EFS) beeinflusst. Ein schlechtes OS wurde am stärksten durch eine geringe Expression der miR-21 (RR = 4,5, 95% CI, 1,4-14,0,  $P = 0,010$ ) und miR-27a (RR = 4,6, 95% CI, 1,5-13,6,  $P = 0,007$ ) beeinflusst. Zusätzlich zu miR-127 wurde das EFS am stärksten durch let-7g und miR-19a beeinflusst. Ein reduziertes Expressionslevel von let-7g führte zu einem signifikant längeren EFS (RR = 0,2, 95% CI, 0,1-0,6,  $P = 0,002$ ), während ein reduziertes miR-19a-Expressionslevel mit einem signifikant kürzeren EFS korreliert (RR = 4,2, 95%, 1,5-11,8,  $P = 0,005$ ).

Tab. 12: Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der initialen Diagnose (n = 53).

Charakteristika	Patientenanzahl	%
Geschlecht		
männlich	31	58,5
weiblich	22	41,5
mittleres Alter, Spanne (Jahre)	63 (20-75)	
IPI-Faktoren		
Alter > 60 Jahre	29	54,7
LDH > N	14	26,4
ECOG > 1	7	13,2
Stadium III/IV	26	49,1
extranodaler Befall > 1	12	22,6
IPI-Punkte		
0, 1	28	52,8
2	11	20,8
3	7	13,2
4, 5	7	13,2
Behandlung		
6 × CHOP-21	15	28,3
6 × CHOP-14	10	18,9
6 × CHOEP-21	14	26,4
6 × CHOEP-14	14	26,4
Ereignisfreies Überleben (Rate, 95% CI)		
3-Jahre	71,2% (58,8-62,4)	
5-Jahre	54,7% (41,4-68,0)	
Gesamtüberleben (Rate, 95% CI)		
3-Jahre	66,9% (54,0-79,8)	
5-Jahre	48,9% (35,4-83,5)	

## 4.2 Funktionelle Analysen der miRNA-205

Für die Analyse und Auswertung der miRNA-Expressionsprofile verschiedener Lymphomentitäten war es wichtig, gleichzeitig gesundes Gewebe als Referenz zu untersuchen. Dazu standen verschiedene lymphatische Organe im menschlichen Organismus zur Verfügung.

Die lymphatischen Organe sind strukturierte Gewebe, die in einem Netzwerk von nicht-lymphatischen Zellen große Mengen an Lymphocyten enthalten. In diesen Organen sind die Wechselwirkungen der Lymphocyten mit den nicht-lymphatischen Zellen für die Entwicklung der Lymphocyten, das Einleiten von adaptiven Immunreaktionen oder das Überleben der Lymphocyten von Bedeutung. Lymphatische Organe lassen sich in zentrale oder primäre lymphatische Organe, in denen die Lymphocyten gebildet werden, und in periphere oder sekundäre lymphatische Organe, in denen die adaptiven Immunantworten eingeleitet und die Lymphocyten stabilisiert werden, einteilen. Die zentralen lymphatischen Organe sind das Knochenmark und der Thymus. Sowohl B- als auch T-Lymphocyten entstehen im Knochenmark, aber nur die B-Lymphocyten reifen auch dort. Die T-Lymphocyten wandern zum Thymus, wo ihre Reifung erfolgt.

Zu den peripheren lymphatischen Organen gehören die Lymphknoten, die Milz und das lymphatische Gewebe der Schleimhäute. Die Lymphocyten zirkulieren kontinuierlich durch diese Gewebe, in die auch Antigene durch Makrophagen und dendritische Zellen aus Infektionsherden transportiert werden. Innerhalb der lymphatischen Organe präsentieren spezialisierte Zellen, wie z.B. reife dendritische Zellen, den Lymphocyten die Antigene.

Die Lymphknoten sind hochorganisierte lymphatische Strukturen und befinden sich dort, wo die Gefäße des lymphatischen Systems zusammenlaufen. Die B-Zellen sind in den Lymphknoten in Follikeln lokalisiert, während die T-Zellen eher unregelmäßig in den umgebenden paracorticalen Bereichen verteilt sind, die man auch als T-Zell-Bereiche bezeichnet. Einige B-Zell-Follikel enthalten Keimzentren, in denen die B-Zellen stark proliferieren, nachdem sie ihrem spezifischen Antigen und T-Helferzellen begegnet sind. In den anderen peripheren lymphatischen Geweben sind B- und T-Zellen auf ähnliche Weise getrennt.

Die Milz nimmt Antigene aus dem Blut auf. Zusätzlich sammelt und beseitigt sie auch gealterte rote Blutkörperchen. Ein Großteil der Milz besteht aus der roten Pulpa, in der die roten Blutkörperchen abgebaut werden. Die Lymphocyten umgeben die Arteriolen, die in das Organ eintreten, und bilden so die Bereiche der weißen Pulpa, deren innerer Bereich sich in die

PALS-Region (*periarteriolar lymphoid sheath*), die zahlreiche T-Zellen enthält, und eine flankierende B-Zell-Corona gliedert.

Das mit der Schleimhaut assoziierte Lymphgewebe des Darmtraktes bezeichnet man als darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (*gut-associated lymphoid tissues*, GALT). Die Tonsillen bilden in der Mundhöhle den so genannten lymphatischen Rachenring. Dabei handelt es sich um eine größere Ansammlung lymphatischen Gewebes in der Schleimhaut. Andere in der Auslösung von Immunantworten wichtige Stellen im Immunsystem der Darmschleimhaut sind die Peyerschen Plaques im Dünndarm und im Blinddarm sowie vereinzelte Lymphfollikel im Dickdarm und Mastdarm. Die Peyerschen Plaques sind außerordentlich wichtig für die Auslösung von Immunantworten im Dünndarm und haben mit ihren kuppelförmigen Strukturen, die in das Darmlumen hineinragen, einen charakteristischen Aufbau.

#### 4.2.1 Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von Lymphknoten und Tonsillen

Aus Gründen der Durchführbarkeit wurde sich entschieden, Lymphknoten und Tonsillen auf ihre Eignung als Referenzgewebe zu untersuchen. Dazu erfolgten die Messungen der miRNA-Expressionsprofile von drei Lymphknoten und elf Tonsillen.

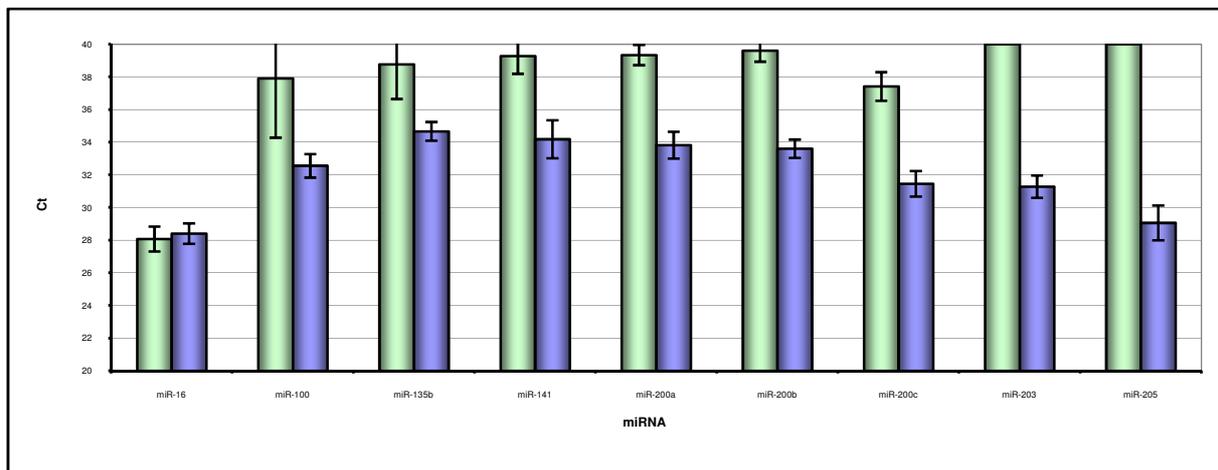


Abb. 12: Vergleich der durchschnittlichen Expressionsprofile von Lymphknoten (grün) und Tonsillen (blau). Die ubiquitär exprimierte miR-16 ist in beiden Geweben gleichmäßig stark exprimiert. MiR-100, miR-135b, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203 und miR-205 zeigen dagegen große Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen Lymphknoten und Tonsille.

Die Analysen in Tonsillen und Lymphknoten ergaben, wie erwartet, ein recht gleichmäßiges Expressionsniveau für die meisten der 157 untersuchten miRNAs. Beispielhaft dafür ist die miR-16 in Abb. 12 dargestellt. Aus diesem Grund fand in diesem ersten Schritt auch keine Normalisierung auf eine bestimmte miRNA statt, da die Werte direkt miteinander vergleichbar waren. Nur acht miRNAs zeigten signifikante Differenzen zwischen den beiden Gewebetypen. Dabei handelt es sich um die miR-100, miR-135b, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203 und miR-205 (siehe Abb. 12). Die durchschnittlichen Expressionsstärken zeigte besonders bei miR-203 und miR-205 sehr große Unterschiede. So konnten beide miRNAs in Lymphknoten nicht detektiert werden, während in Tonsillen der Durchschnittswert für miR-203 bei 31,3 Ct und für miR-205 sogar bei 29,1 Ct lag. Dies entspricht einer Differenz um das 422-fache für miR-203 und sogar um das 2048-fache für miR-205. In Abb. 13 sind für diese beiden miRNAs die entsprechenden Einzelergebnisse der untersuchten Gewebe dargestellt. Um einen direkten Vergleich der Einzelergebnisse zu erlauben, fand nun auch eine Normalisierung auf miR-16 statt. Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse ist im Anhang aufgeführt.

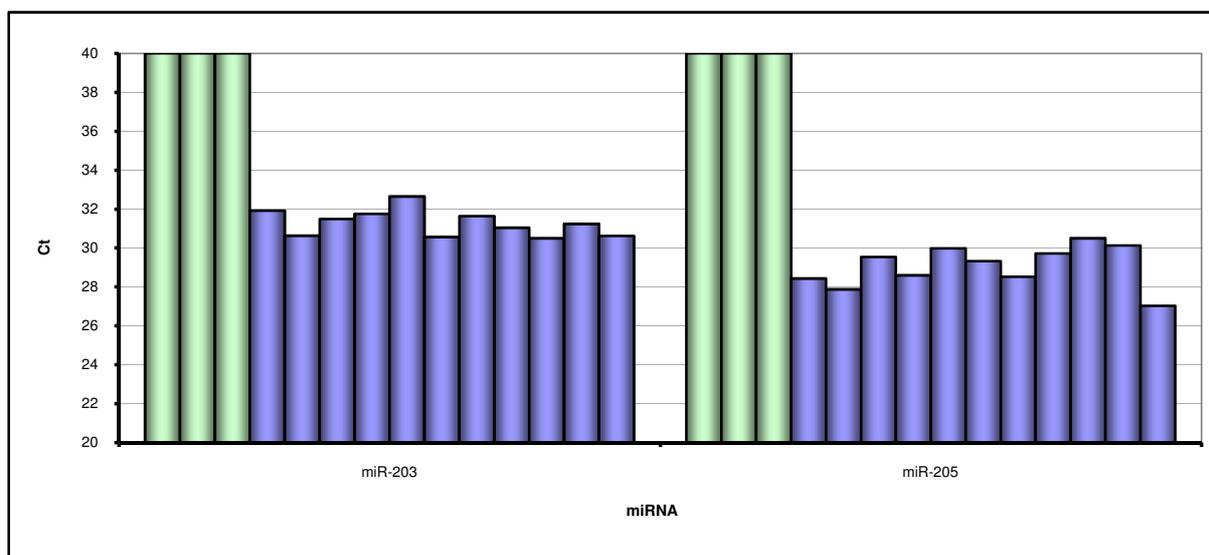


Abb. 13: Einzelergebnisse der Messungen von miR-203 und miR-205 in Lymphknoten (grün) und Tonsillen (blau) nach Normalisierung auf miR-16.

#### 4.2.2 Expressionsmuster von miRNA-205 in diversen Geweben und Organen

Nachdem, anders als erwartet, deutliche Expressionsunterschiede einzelner miRNAs (insbesondere miR-205 und miR-203) beim Vergleich von Lymphknoten und Tonsillen detektiert wurden, sollte in nachfolgenden Untersuchungen die Ursache dessen herausgefunden werden. Bei beiden Gewebetypen handelt es sich um Teile des lymphatischen Systems mit ähnlichen Bestandteilen (B-Zellen und T-Zellen). Die Regulation der Genexpression in diesen Zellen sollte eigentlich durch die steuernde Wirkung der gleichen miRNAs erfolgen. Auch sind beim Vergleich von Tonsillen und Lymphknoten auf mRNA-Ebene keine größeren Unterschiede in den Expressionsleveln detektiert worden<sup>176</sup>.

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen gab es noch keine Veröffentlichungen über das Vorkommen oder die Funktion der miR-205. Da diese aber besonders auffällige Unterschiede zeigte, sollte in einer ersten Analyse das allgemeine Vorkommen von miR-205 untersucht werden. Anhand dieser Ergebnisse wäre es nachfolgend möglich aufzudecken, welche Funktionen und Lokalisationen die miR-205 hat und eine Erklärung für die massiven Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen Tonsillen und Lymphknoten zu finden.

Dazu wurde aus verschiedensten Organen und Geweben RNA extrahiert und die Expression von miR-205 gemessen. Um eine Normalisierung durchzuführen, wurde parallel dazu auch eine Messung der ubiquitär exprimierten U6 durchgeführt. Von allen Organen/Geweben wurden mindestens zwei verschiedene Proben untersucht. Die Messungen erfolgten in Doppelbestimmungen. Die untersuchten Proben wurden zuvor von einem Pathologen begutachtet und, wenn notwendig, kranke oder entzündete Teile entfernt.

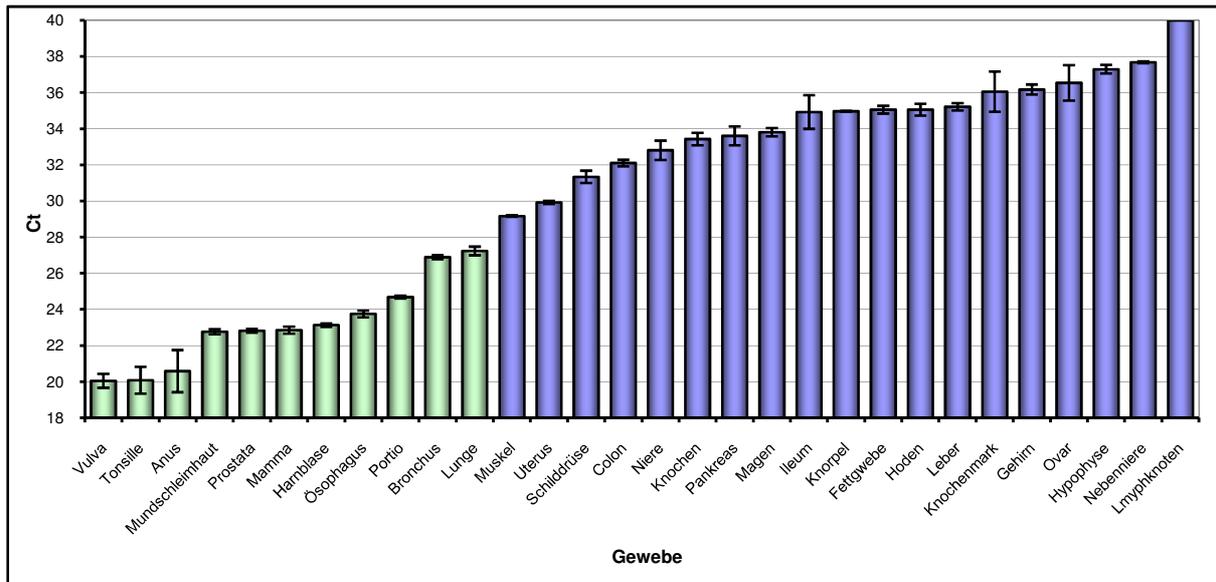
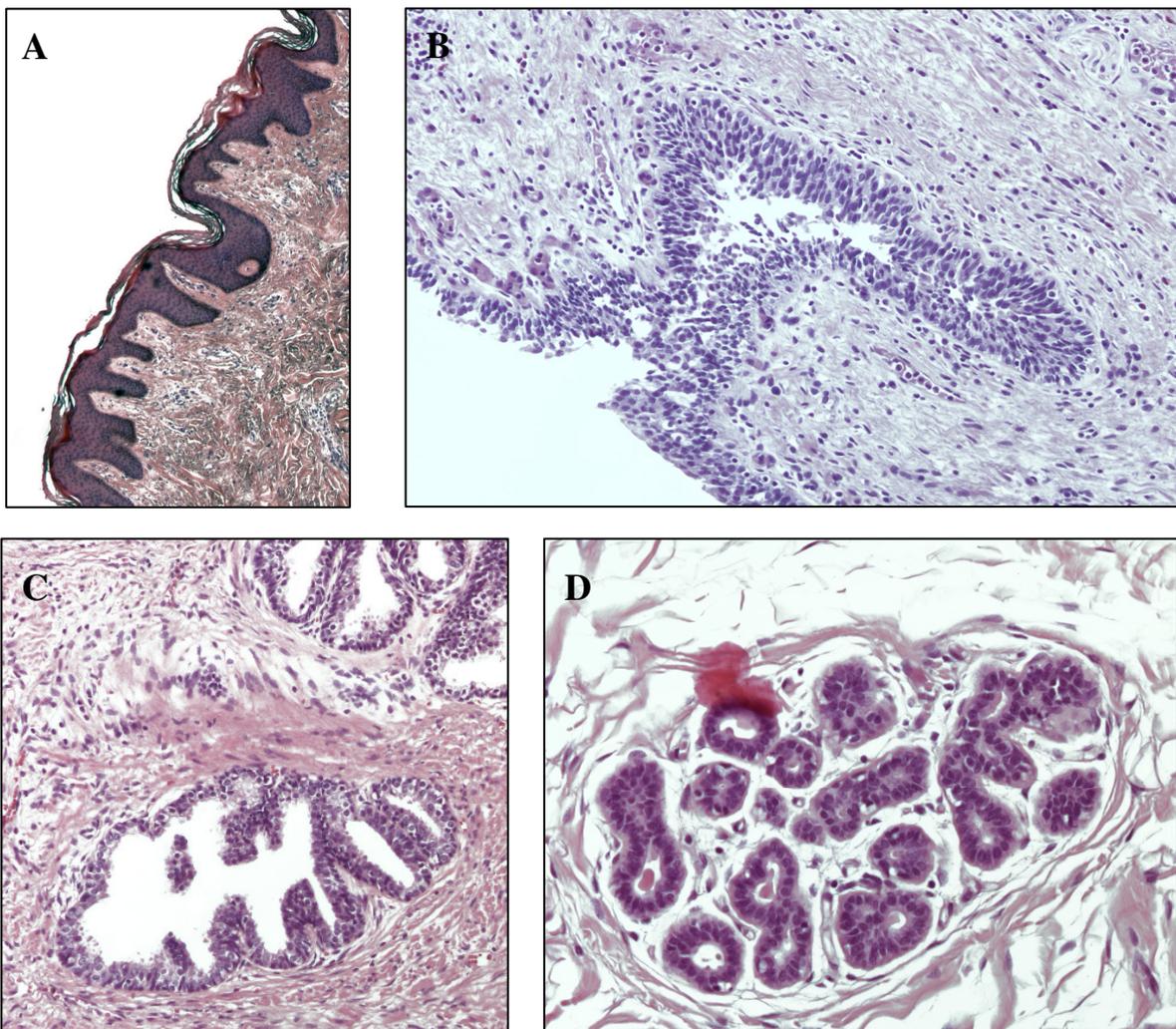


Abb. 14: MiR-205-Expressionslevel in diversen Geweben und Organen. Nach Normalisierung auf die ubiquitär exprimierte U6-RNA sind starke Unterschiede im Expressionsmuster erkennbar.

Die Expressionsstärke der miR-205 war in den verschiedenen untersuchten Geweben und Organen sehr variabel (siehe Abb. 14 und Anhang). Sie reichte von sehr starken Leveln in Vulva (20,1 Ct) und Tonsille (20,1 Ct) bis zur Nicht-Nachweisbarkeit in Lymphknoten (40 Ct). Dies entsprach einer mehr als 1000000-fach stärkeren Expression zwischen den Geweben/Organen mit dem stärksten und dem schwächsten miR-205 Vorkommen. Dieses spezifische Auftreten erhärtete die Vermutung, dass die miR-205 definierte Aufgaben in diesen Organen/Geweben übernimmt; es sich also nicht um eine ubiquitär exprimierte miRNA wie z.B. miR-16 handelt. Die Frage, die sich an diese Ergebnisse anschloss, war, welche Gemeinsamkeit die Organe/Gewebe mit starker miR-205-Expression (Vulva, Tonsille, Anus, Mundschleimhaut, Prostata, Mamma, Harnblase, Ösophagus, Portio, Bronchus und Lunge) haben bzw. was sie von denen mit geringer/keiner Expression unterscheidet? Dazu wurden im Folgenden weitere Analysen durchgeführt.

### 4.2.3 Lokalisation der miRNA-205 Expression in Geweben mit hohen Expressionsleveln

In den primär vorgenommenen Untersuchung, über die Verbreitung der miR-205, wurden Organe/Gewebe analysiert, die aus einem Konglomerat verschiedenster Zellpopulationen bestanden (siehe 4.2.2). Dies war in einem ersten Untersuchungsschritt eine praktikable Variante um relativ schnell große Informationsmengen zu erhalten, machte aber eine Eingrenzung auf einen bestimmten Zelltyp, in dem miR-205 besonders stark exprimiert ist, unmöglich. Da aber eines der Untersuchungsziele war, eine genaue Lokalisation durchzuführen, wurde nach Gemeinsamkeiten der Gewebe bzw. Organe mit starker miR-205 Expression gesucht. Zu den auffälligsten Übereinstimmungen gehörte das Vorhandensein einer Epithelschicht. Beispielfürhaft dafür ist in Abb. 15 Epithelgewebe von Anus, Ösophagus, Mundschleimhaut, Harnblase, Mamma, Portio, Prostata und Vulva dargestellt. Dabei handelt es sich sowohl um Platten- als auch um Drüsenepithel, Gewebe mit unterschiedlicher Funktion.



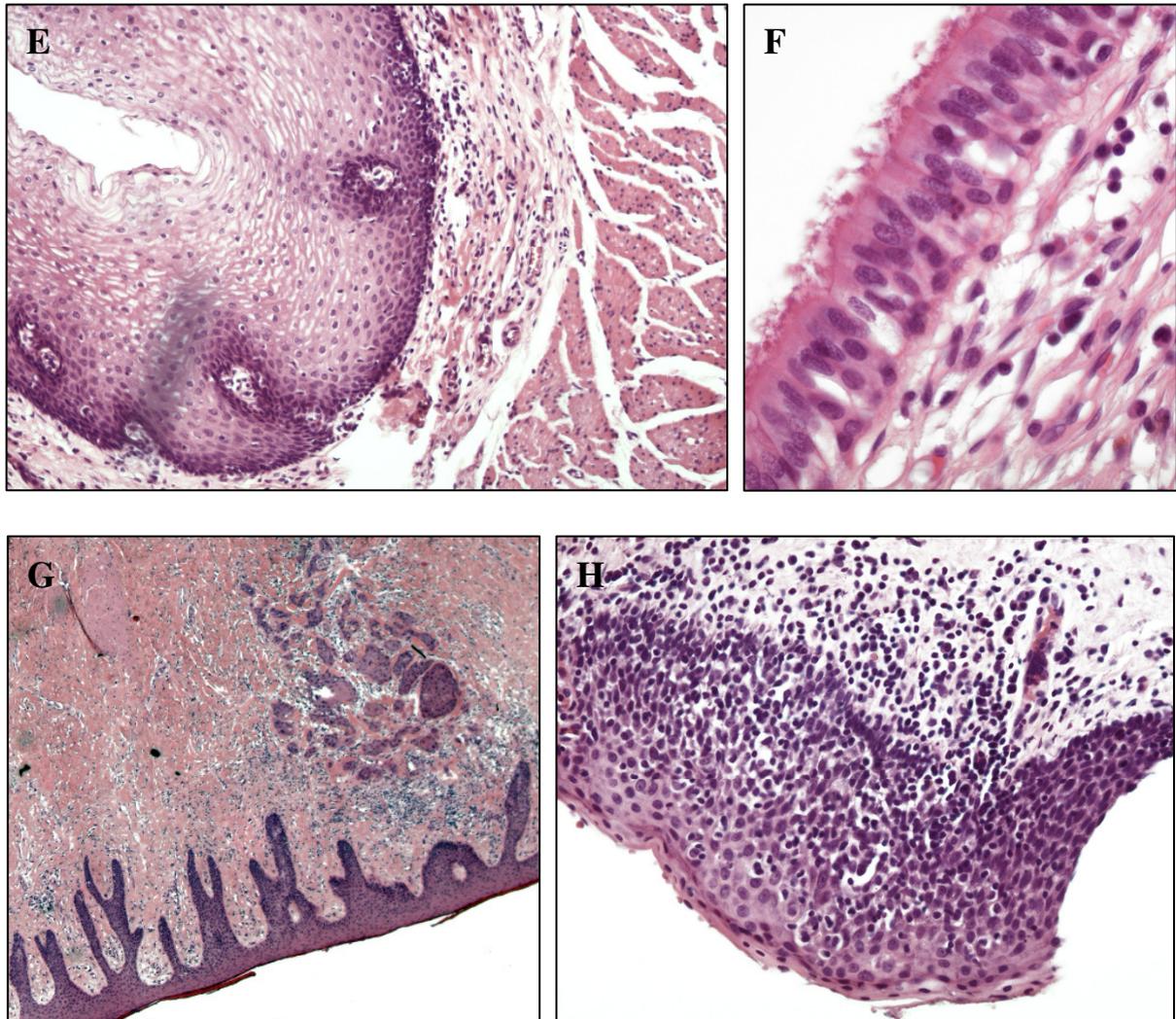


Abb. 15: Beispiele für Epithelschichten in Geweben/Organen mit starker miR-205 Expression. (A) Plattenepithel vom Anus, (B) Blasenepithel, (C) Drüsenepithel der Prostata, (D) Drüsenepithel der Mamma, (E) Plattenepithel des Ösophagus, (F) Bronchusepithel, (G) Plattenepithel der Vulva, (H) Plattenepithel der Mundschleimhaut. In allen Fällen handelt es sich um H&E-Färbungen der Schnitte.

Wie auf den obigen Abbildungen zu erkennen, stellte das Epithel einen signifikanten Anteil der zuvor untersuchten Gewebe/Organe mit starker miR-205 Expression dar. Daher lag die Vermutung nahe, dass die miR-205 Expression mit diesem Zelltyp assoziiert ist. Um dies nachzuweisen, wurden Epithelzellen von Tonsille, Anus, Mundschleimhaut, Mamma, Prostata, Harnblase, Portio, Vulva, Ösophagus und Uterus mikrodisektiert und mit der Expression von Nicht-Epithelzellen des selben Ursprungs verglichen.

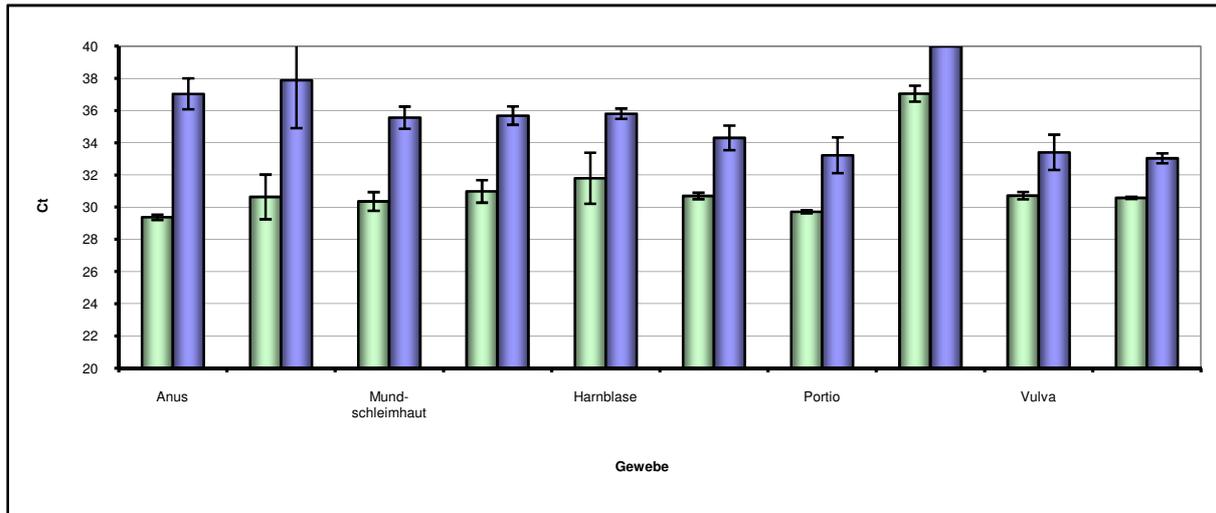


Abb. 16: Vergleich der miR-205 Expressionsstärke in mikrodisssektierten Geweben nach Normalisierung auf die ubiquitär exprimierte miR-16. Zwischen dem Epithel- (grün) und dem Nicht-Epithel-Anteil (blau) ist in allen Fällen eine deutliche Differenz zu erkennen.

Das Expressionslevel der miR-205 war, nach der Normalisierung auf miR-16, in allen untersuchten Fällen im Epithel, verglichen mit dem Nicht-Epithel-Anteil, deutlich höher, in einigen Fällen sogar darauf beschränkt. Den deutlichsten Unterschied fand man im Anusgewebe. So zeigte das daraus gewonnene Epithelgewebe einen Ct-Wert von 29,4, das Nicht-Epithelgewebe dagegen einen Wert von 37,1. Dies entsprach einer Differenz um das 203-fache. Auch in den untersuchten Tonsillen war die miR-205 Expression hauptsächlich in Epithel zu finden (30,7 Ct vs 37,9 Ct; 152-facher Unterschied). Deutlich geringere Differenzen waren in den übrigen analysierten Geweben zu finden (siehe Abb. 16), aber auch in diesen Fällen blieb die Tendenz der höheren miR-205 Expression im Epithelgewebe erhalten. Den geringsten, in dieser Analyse gefundenen, Unterschied um das 5-fache zeigte das Ösophagusgewebe (30,6 Ct vs 33,1 Ct). Eine tabellarische Auflistung der Ergebnisse ist im Anhang zu finden.

#### 4.2.4 Nachweis der miRNA-205-Expression in Karzinomen

Nachdem die Analyse der genauen miR-205-Lokalisation ergeben hatte, dass diese vorwiegend in Epithelzellen exprimiert wird, sollte in einem weiteren Schritt herausgefunden werden, ob diese erhöhte Expression auch in Karzinomen nachzuweisen ist.

Bei Karzinomen handelt es sich um maligne Tumore des Epithels. Sie können in endo- und exokrinen Drüsen, parenchymatösen Organen wie Leber und Niere und in der Schleimhaut des Magen-Darm-Trakts, des Urogenitaltrakts, des Respirationstrakts und in der Haut entstehen. Karzinome werden hinsichtlich ihres Phänotyps in Plattenepithelkarzinome, Übergangsepithelkarzinome, Adenokarzinome, Basalzellkarzinome und andere unterteilt.

Beim Plattenepithelkarzinom handelt es sich um squamös differenzierte Karzinome mit oder ohne Verhornung. Sie entstehen hauptsächlich im Plattenepithel (Haut, Mund-, Ösophagusschleimhaut, Vagina) oder in Plattenepithelmetaplasien. Das Übergangsepithelkarzinom (Transitionalkarzinom) ähnelt dem Urothelphänotyp. Der Tumor findet sich im Übergangsepithel der ableitenden Harnwege (Nierenbecken, Ureter, Harnblase, Urethra, Prostata). Adenokarzinome sind dagegen epitheliale Tumore mit drüsigem Phänotyp. Sie finden sich im Drüsenepithel der Schleimhäute (Magen-Darm-Trakt, Respirationstrakt), Leber, Niere sowie in exokrinen und endokrinen Drüsen. Basalzellkarzinome (Basaliome) entstehen aus den Zellen der Basalzellschicht, z.B. der Haut und den Wurzelscheiden der Haarfollikel.

Zur Untersuchung der miR-205 Expressionsstärke in Karzinomen, der vier oben beschriebenen Entitäten, wurde RNA extrahiert. Analysiert wurden zwei Proben von Basalzellkarzinomen, sechs Proben von Übergangsepithelkarzinomen, neun Proben von Plattenepithelkarzinomen und neun Proben von Adenokarzinomen. Das Material wurde von einem Pathologen begutachtet und nur Areale mit einem Tumorgehalt von mindestens 80% für die weitere Analyse benutzt. Die Tumorzellen der Basalzellkarzinome wurden mittels Laser-Mikrodissektion isoliert. Parallel zu den miR-205 Messungen erfolgten U6 Messungen, welche für die anschließende Normalisierung genutzt wurden. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmungen. Die so erhaltenen Daten, wurden mit den miR-205 Werten der elf Organe mit den höchsten Expressionsleveln verglichen (siehe 4.2.2).

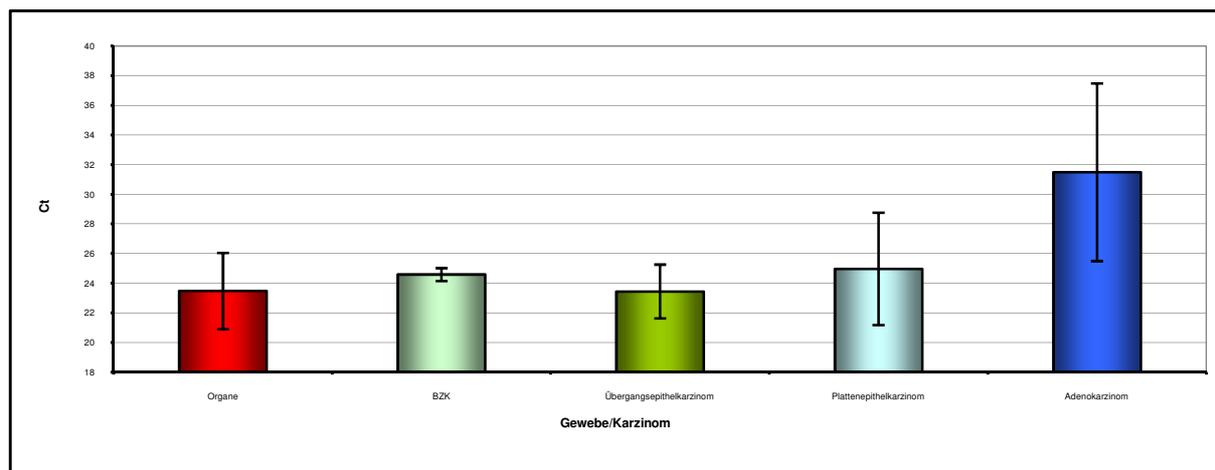


Abb. 17: Mittleres miR-205 Expressionslevel, nach Normalisierung auf die ubiquitär exprimierte U6, in diversen Fällen von Basalzell- (BZK), Übergangsepithel-, Plattenepithel- und Adenokarzinomen. Als Vergleich ist der durchschnittliche miR-205 Wert von elf Organen mit starker Expression aufgeführt.

Die mittlere Stärke der miR-205 Expression war in Basalzell-, Übergangsepithel- und Plattenepithelkarzinomen vergleichbar mit der der Organe (siehe Abb. 17). Sie betrug für die Vergleichsorgane 23,5 Ct, für die Basalzellkarzinome 24,6 Ct, für die Übergangsepithelkarzinome 23,5 Ct und für die Plattenepithelkarzinome 25,0 Ct. Die Schwankungsbreite war dabei besonders innerhalb der Basalzell- und Übergangsepithelkarzinome mit 0,4 bzw. 1,8 Ct relativ gering. Dies deutete darauf hin, dass das hohe Expressionslevel in allen untersuchten Proben zu finden war. Beim Plattenepithelkarzinom war die Schwankungsbreite mit 3,8 Ct etwas höher als bei den anderen beiden Entitäten, lag aber immer noch etwa im gleichen Schwankungsbereich wie die der Vergleichsorgane mit einem Ct von 2,6. Einige Abweichungen von diesen Ergebnissen waren bei der Gruppe der Adenokarzinome zu erkennen. Sie lagen, mit einem durchschnittlichen Ct von 31,5, zum einen deutlich über den Werten der anderen untersuchten Entitäten, zum anderen war die Schwankungsbreite mit einer Standardabweichung von 6 Ct auch relativ groß. Dies deutete auf eine inhomogene Gruppe, bezüglich der miR-205 Expression, hin.

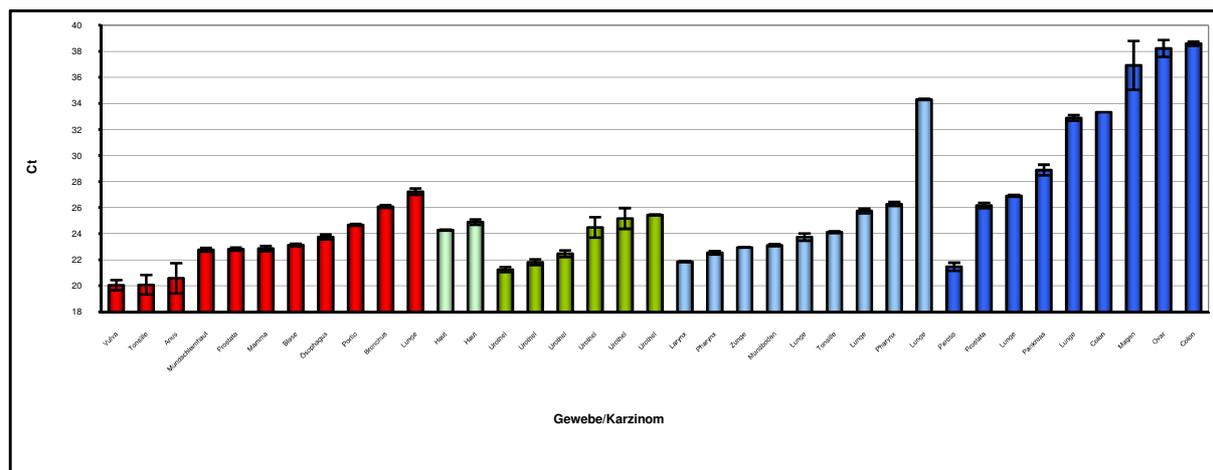


Abb. 18: Einzeldarstellung der miR-205 Expression in Organen und verschiedenen Karzinomarten nach Normalisierung auf U6. rot: Organe; hellgrün: Basalzellkarzinome; dunkelgrün: Übergangsepithelkarzinome; hellblau: Plattenepithelkarzinome; dunkelblau: Adenokarzinome

Bei einer näheren Betrachtung der Einzelergebnisse (siehe Abb. 18), bestätigte sich die Homogenität der Basalzell- und Übergangsepithelkarzinome. So wurde für die beiden Basalzellkarzinome aus Hautproben Ct-Werte von 24,3 bzw. 24,9 für die miR-205 Expression gemessen. Auch für die sechs Übergangsepithelkarzinome aus Urothelgewebe konnten recht einheitliche Ct-Werte festgestellt werden, die sich im Rahmen von 21,3 bis 25,5 bewegten. Die Mehrheit der untersuchten Plattenepithelkarzinome zeigte ebenfalls eine relativ konstante miR-205 Expressionsstärke, die sich zwischen 21,9 Ct und 26,3 Ct bewegte. Nur das Messergebnis eines Karzinoms aus der Lunge wich, mit einem Ct-Wert von 34,3 nach Normalisierung, relativ deutlich von den übrigen Proben ab. Dies war auch die Erklärung für eine höhere Standardabweichung im Vergleich zu den beiden zuvor dargestellten Entitäten (siehe Abb. 17). Ein völlig anderes Bild zeigte sich in der Gruppe der Adenokarzinome. Die Schwankungsbreite der untersuchten Gewebe war sehr ausgeprägt, sie lag zwischen 21,5 Ct für die Parotis-Probe bis hin zu 38,6 Ct, also fast nicht mehr nachweisbar, für eine Colon-Probe. Zudem war feststellbar, dass, bis auf die Parotis-Probe, alle Expressionslevel der untersuchten Adenokarzinome oberhalb der Mittelwerte der zuvor beschriebenen Karzinomentitäten lagen. Die allgemeine Expressionsstärke der miR-205 war also in den Adenokarzinomen deutlich niedriger als in den anderen drei Gruppen und die Parotis-Probe eher als Ausnahme innerhalb dieser zu betrachten. Eventuell handelt es sich dabei auch um einen Misch tumor. Eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse ist im Anhang zu finden.

#### 4.2.5 Nachweis von miRNA-205 Expression in diversen Zelllinien

Nachdem es möglich war, die Expression der miR-205 sowohl in Epithel- als auch Karzinomzellen nachzuweisen, sollte in einem nächsten Schritt eine eventuelle Expression auch in Zelllinien nachgewiesen werden. Dies sollte zum einen der weiteren Bestätigung einer epithelspezifischen Expression dienen, zum anderen aber auch der Vorbereitung von *in vitro* Experimenten. Aus diesem Grund wurden drei Karzinomzelllinien (T24, KU-19-19, TCC-SUP), eine embryonale Nierenzelllinie (HEK-293), eine Leukämie- (JURKAT) und zwei Lymphomzelllinien (U937, RAMOS) ausgewählt. Alle drei Karzinomzelllinien wurden ursprünglich aus malignem Gewebe der Harnblase etabliert, wobei es sich sowohl bei TCC-SUP als auch KU-19-19 um Übergangsepithel handelte. Um eine eventuelle miR-205 Expression in Nicht-Epithel-Zelllinien zu untersuchen bzw. auszuschließen, wurden drei Lymphom- und Leukämiezelllinien in die Analyse eingeschlossen. Abschließend wurden auch noch Messungen der HEK-293 Zelllinie durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Zelllinie nicht-epithelialen Ursprungs. Hauptsächlich diente diese Untersuchung aber der Vorbereitung auf nachfolgende Experimente im Zellkultursystem. Bei HEK-293 handelt es sich um eine leicht zu kultivierende Zelllinie, für die zudem schon optimierte Transfektionsprotokolle existieren.

Von allen Zelllinien wurde Gesamt-RNA isoliert und die Expressionsstärken der miR-205 und der ubiquitär exprimierten U6 gemessen. Diese wurde anschließend für die Normalisierung der miR-205 Werte genutzt. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmung.

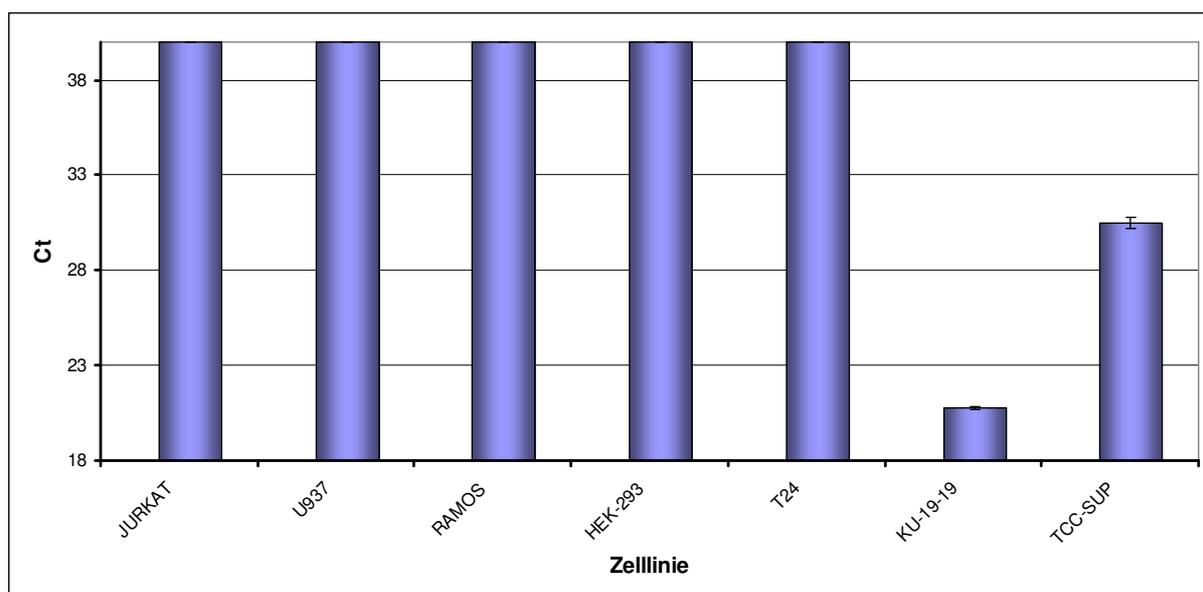


Abb. 19: Detektion der miR-205-Expression in diversen Zelllinien. Nach Normalisierung auf das U6-Expressionslevel ist in den Zelllinien KU-19-19 und TCC-SUP eine miR-205-Expression nachweisbar.

In den meisten untersuchten Zelllinien war eine Expression der miR-205 nicht nachweisbar (siehe Abb. 19). Dazu gehörten erwartungsgemäß alle Zelllinien, die von nicht-epithelialem Gewebe abstammen (JURKAT, U937, RAMOS, HEK-293). Die drei analysierten Karzinomzelllinien zeigten eine sehr unterschiedliche miR-205 Expression. So war bei T24 Zellen keinerlei Expression nachweisbar, wohingegen in TCC-SUP und in KU-19-19 Zellen miR-205 exprimiert wurde. Die Expression war insbesondere in der letztgenannten Zelllinie mit 20,8 Ct nach U6-Normalisierung relativ hoch. Durch die Variabilität der miR-205 Expressionen in den Karzinomzelllinien ist es vorteilhaft für nachfolgende *in vitro* Experimente alle drei Linien zu benutzen. So können Ergebnisse unter drei verschiedenen Bedingungen (starke, schwache, keine miR-205 Expression) erzielt werden, was die nachfolgende Interpretation vereinfachen kann. Anzumerken ist auch, dass in HEK-293 Zellen keine miR-205 Expression nachgewiesen werden konnte. Dadurch eignet sich diese Zelllinie besonders für Experimente, in denen ein künstliches miR-205 Vorläufermolekül in die Zellen eingebracht werden soll.

#### 4.2.6 Detektionslimit von miRNA-205 (Verdünnungsreihen)

Nachdem die miR-205-Expression in vielen Organen, Geweben und Zelllinien nachgewiesen werden konnte, sollte in einem weiteren Versuch die Sensitivität der Detektion untersucht werden. Dies ist vor allem dafür wichtig, eine grobe Abschätzung der Anzahl von Zellen zu tätigen, die miR-205 exprimieren. Gerade in einem Gemisch von sehr unterschiedlichen Zelltypen ist so eine Aussage über die relative Anzahl an Epithelzellen möglich.

Um eine Verdünnungsreihe herzustellen, wurden miR-205 exprimierende Zellen der Linie KU-19-19 mit Zellen der Linie T24, die keine miR-205-Expression zeigen, in unterschiedlichen Verhältnissen (1:10 bis 1:100000) zueinander gemischt. Anschließend wurde Gesamt-RNA aus diesen Gemischen isoliert und qRT-PCRs der miR-205 und miR-16 durchgeführt. Die gewonnenen Daten der einzelnen Ansätze wurden mittels der ubiquitär exprimierten miR-16 normalisiert. Dadurch war abschließend ein direkter Vergleich der miR-205-Expressionslevel möglich. Alle Ansätze erfolgten in einem Dreifachansatz.

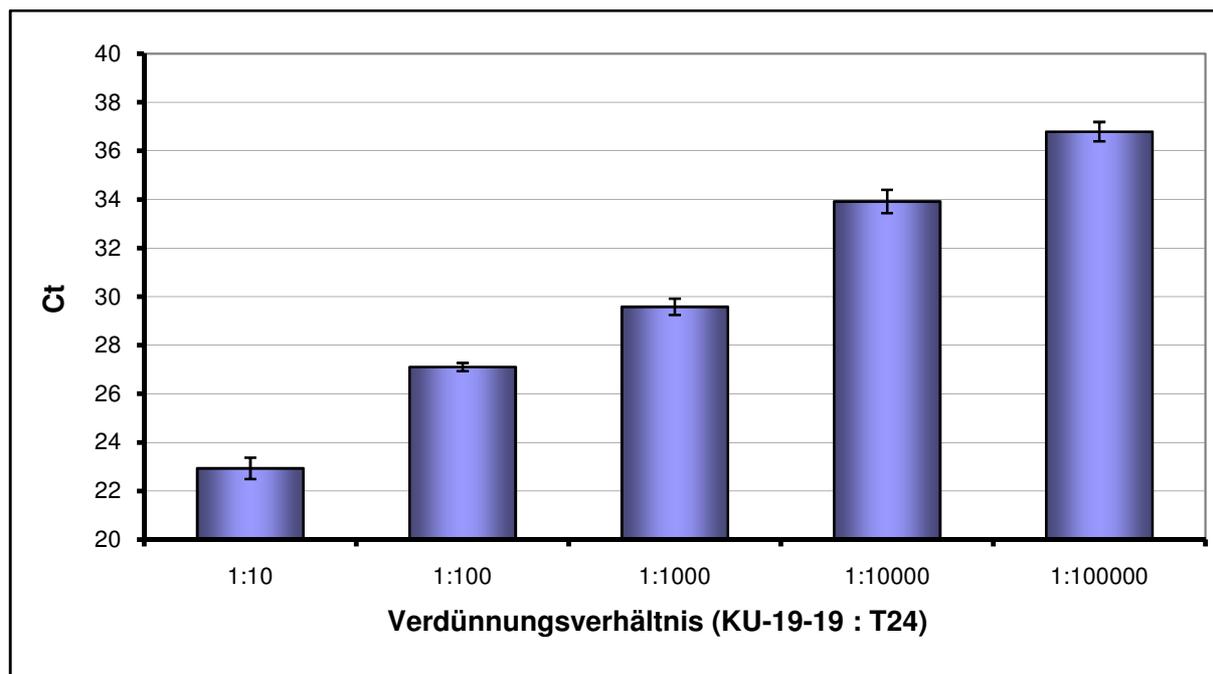


Abb. 20: MiR-205-Expressionslevel in verschiedenen Verdünnungsstufen zweier Zelllinien nach Normalisierung auf miR-16.

Wie schon aus ähnlichen Versuchen mit qRT-PCRs von mRNAs bekannt ist, handelt es sich bei dieser Detektionsart um eine extrem sensitive Methode. So war es möglich, die miR-205-Expression einer einzigen Zelle in einem Gemisch mit 100000 Zellen ohne entsprechende Expression nachzuweisen. In einem 1:10-Verdünnungsansatz konnte die miR-205 mit einem Ct-Wert von 22,9 nachgewiesen werden, in einer 1:100 Verdünnung von 27,1, in einer 1:1000 Verdünnung von 29,6, in einer 1:10000 Verdünnung von 33,9 und in einer 1:100000 Verdünnung von 36,8. Eine detaillierte Tabelle mit allen Daten ist im Anhang aufgeführt.

#### 4.2.7 Nachweis von miRNA-205 Expression in Sentinellymphknoten

Die zuvor nachgewiesene Sensitivität sollte nun eine praktische Anwendung finden. Dazu sollte der Befall eines sogenannten Sentinellymphknoten (Wächterlymphknoten) mit Karzinomzellen indirekt durch die Detektion einer miR-205-Expression nachgewiesen werden. Als Sentinellymphknoten wird der Lymphknoten bezeichnet, der zu vorderst im Abflussgebiet der Lymphe eines Tumors liegt. Durch Verschleppung von Tumorzellverbänden im Lymphfluss ist eine regionale Metastasierung dieses primären Tumors möglich. In diesem Rahmen kommt dem Sentinellymphknoten sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie Bedeutung zu, da dieser Lymphknoten als erster von einer Metastasierung betroffen ist. Üblicherweise wird

ein  $^{99m}\text{Tc}$ -markiertes Nano-Kolloid in unmittelbarer Nähe des Tumors oder auch in die Haut über dem Tumor appliziert. Dieser Marker verbreitet sich über die Lymphabflusswege und reichert sich in einem oder mehreren Sentinellymphknoten an. Diese Anreicherung kann anschließend dargestellt werden und eine gezielte Entfernung während der Operation ist möglich. Abschließend kann der „Status“ des Lymphknotens histopathologisch ermittelt werden. Die Detektion von karzinom-/epithelspezifischen miRNAs in diesen Lymphknoten wäre eine alternative Methode zum klassischen Nachweis von Metastasierung mittels Immunhistochemie. Als „Marker“ bietet sich dabei besonders die miR-205 an, da sie in Epithel- und Karzinomzellen sehr stark, in Lymphknoten dagegen gar nicht exprimiert wird (siehe 4.2.3 und 4.2.4).

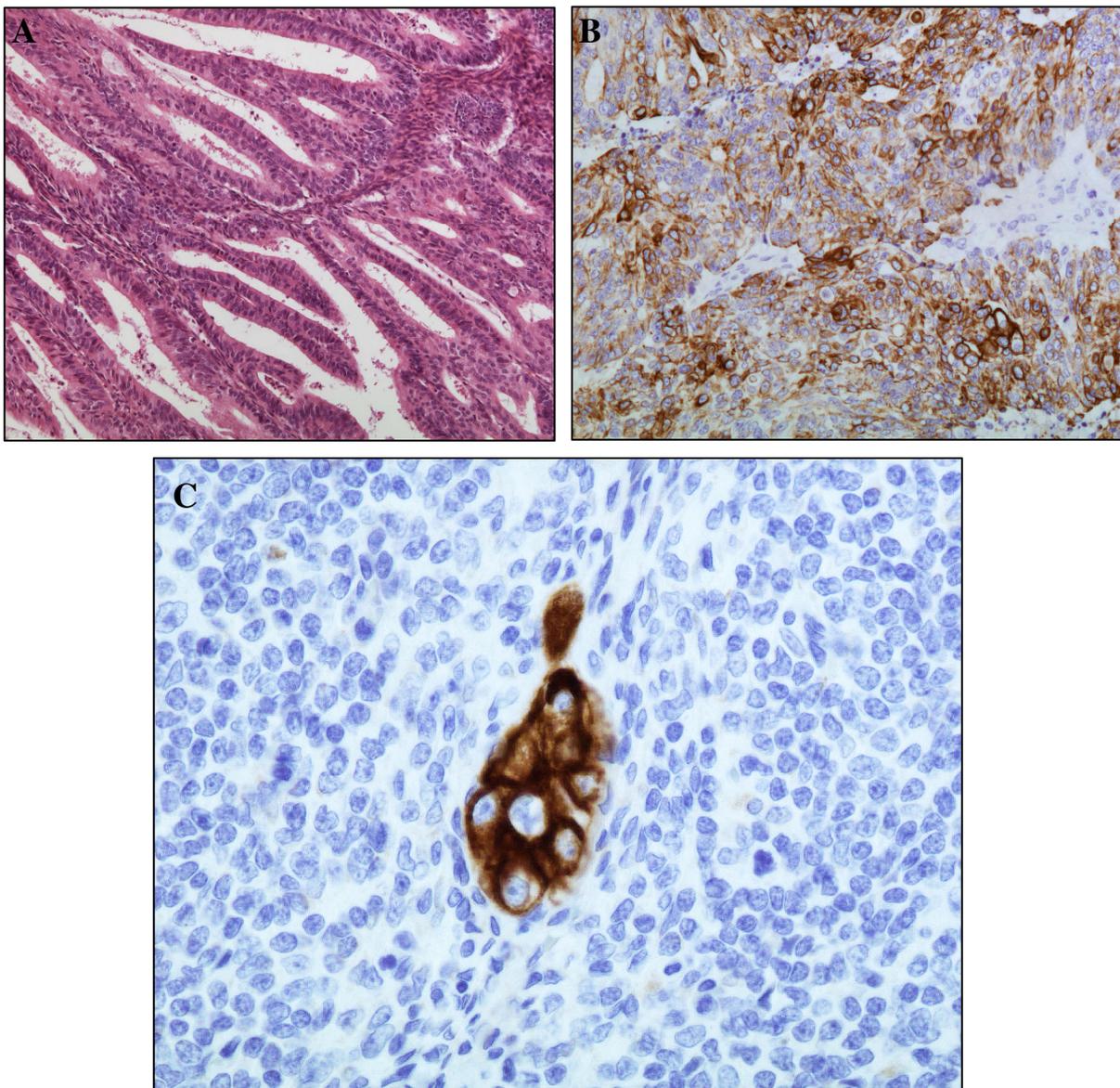


Abb. 21: Immunhistochemisch gefärbte Schnitte der untersuchten Gewebe. A) Haupttumor, B) Lymphknoten mit Metastase und C) Sentinellymphknoten mit Mikrometastase.

Die Expression der miR-205 wurde an vier verschiedenen Geweben untersucht. Dabei handelte es sich um den Haupttumor mit einem Tumorzellgehalt von 80%, einen Lymphknoten mit bekannter Metastase (60% Tumorzellgehalt), einem Sentinellymphknoten mit einer Mikrometastase und einem Lymphknoten ohne Metastase. Von allen Geweben wurde Gesamt-RNA isoliert. Parallel zur miR-205 Expression wurde auch die ubiquitär exprimierte miR-16 untersucht. Anhand dieser wurde die Normalisierung durchgeführt. Von allen Proben erfolgte eine Doppelbestimmung.

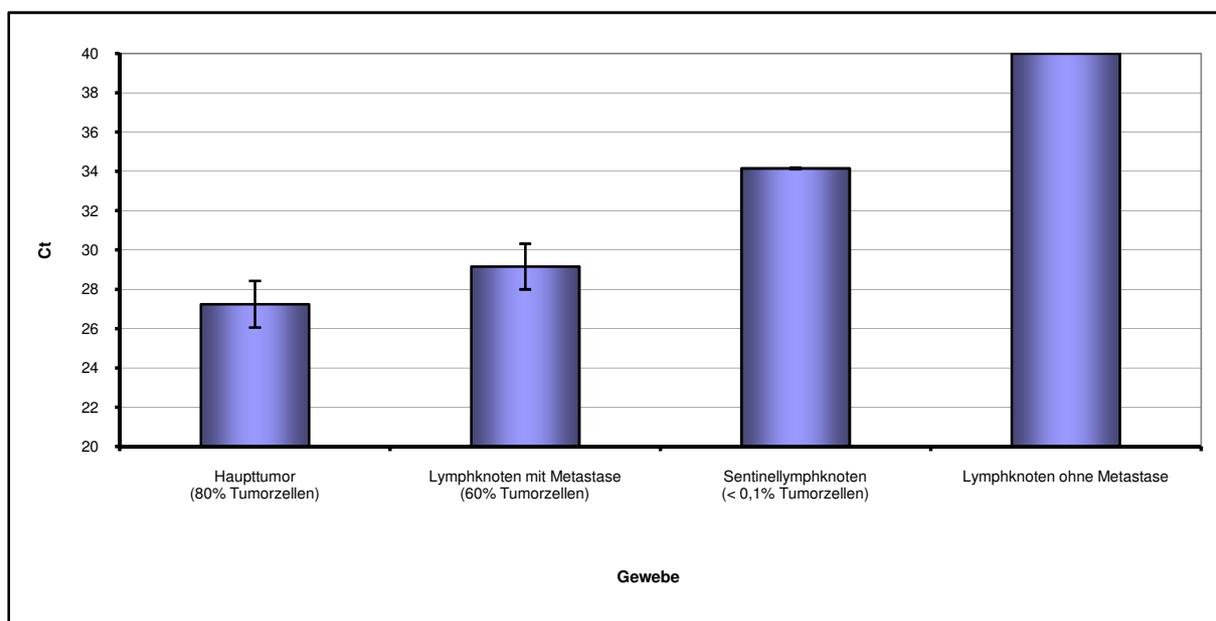


Abb. 22: MiR-205-Expression in Sentinellymphknoten. Nachweis von Tumorzellen im Haupttumor, einem Lymphknoten mit und einem ohne bekannte Metastase sowie einem Sentinellymphknoten durch die Detektion von miR-205 in den Geweben.

Der Nachweis einer miR-205-Expression erfolgte im Haupttumor, dem Lymphknoten mit bekannter Metastase und dem Sentinellymphknoten (siehe Abb. 22). Dabei konnte im Haupttumor ein Ct-Wert von 27,3, im Lymphknoten von 29,2 und im Sentinellymphknoten von 34,2 ermittelt werden. Die Ct-Werte konnten mit der Menge an Tumorzellen korreliert werden. Im Lymphknoten ohne Metastasen konnte keine miR-205-Expression nachgewiesen werden. Dies entsprach dem bekannten Bild vom miRNA-Status in Lymphknoten (siehe 4.2.1 und 4.2.2). Die detaillierten Angaben sind im Anhang aufgeführt.

#### 4.2.8 Optimierung der einzusetzenden miRNA-205 Konzentrationen in Transfektionsexperimenten

Ein verbreitetes Verfahren zur Untersuchung der Funktion einzelner Gene im Organismus sind *in vitro* Experimente. Dazu wird die DNA oder RNA von Interesse künstlich in ein Zellsystem eingebracht. Für funktionelle Analysen verschiedener RNA- oder DNA-Moleküle existieren eine Reihe von optimierten Protokollen für unterschiedlichste Zelllinien. Für die transiente Transfektion von miRNA fehlen diese Erfahrungswerte weitestgehend, eine Optimierung muss für die verschiedenen Zellen durchgeführt werden. Dabei geht es primär um die Auswahl geeigneter Zelllinien, den Nachweis von erfolgreichen Transfektionen mit der entsprechenden miRNA und die Bestimmung der minimal notwendigen Konzentration einzusetzender miRNA für ein optimales Transfektionsergebnis.

Durch die Firma Ambion werden für viele bekannte miRNAs künstlich generierte, sogenannte Vorläufermoleküle (Pre-miR<sup>TM</sup> miRNA Precursor Molecules) angeboten. Diese entsprechen den endogen vorhandenen Pre-miRNAs in der Zelle und können durch Transfektion in die Zellen eingebracht werden. Wie bei natürlich vorkommenden miRNAs werden auch die künstlichen durch weitere Prozessierungsschritte in reife, funktionell aktive miRNAs weiterverarbeitet. Die Vorläufermoleküle haben gegenüber dem Einbringen von reifen miRNAs den Vorteil, dass sie eine deutlich höhere Stabilität aufweisen und nicht durch den endogen vorhandenen RNAi-Mechanismus abgebaut werden. Neben dem künstlichen Einbringen von zusätzlichen miRNAs wird durch die Firma Ambion auch ein System zur Inhibition von endogen vorhandenen miRNAs angeboten. Dieses besteht aus einem sogenannten Anti-miR<sup>TM</sup> miRNA Inhibitor, bei dem es sich um ein *Locked Nucleic Acid* (LNA) Molekül handelt. Diese modifizierte Nukleinsäure zeichnet sich durch einen besonders hohen Schutz gegenüber RNAsen aus und bindet an die in der Zelle vorhandenen miRNAs. Die so gebundenen miRNAs können anschließend nicht mehr ihrer eigentlichen Funktion nachgehen, eine Inhibition ihrer Zielgene bleibt aus.

#### 4.2.8.1 Transfektionsoptimierung für HEK-293 Zellen

In einem ersten Versuch erfolgte eine transiente Transfektion von HEK-293 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (0,5, 5 und 50 nM) des miR-205-Vorläufermoleküls. Diese Zelllinie lässt sich sehr gut mit DNA oder RNA transfizieren. In einer zuvor durchgeführten Untersuchung konnte in dieser Zelllinie keine miR-205 Expression nachgewiesen werden (siehe 4.2.5). Bei den drei eingesetzten Konzentrationen handelte es sich um Mengen, die sich im Rahmen des von der Firma Ambion vorgeschlagenen Bereiches befanden. Nach der Transfektion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Gesamt-RNA isoliert, die Menge an reifer miRNA mittels qRT-PCR gemessen und ein Optimum bestimmt. In einem zweiten Ansatz wurden die so gewonnenen Ergebnisse für den Einsatz in den Karzinomzelllinien T24, KU-19-19 und TCC-SUP ausgetestet und übernommen. Bei diesen Zellen konnten in einem Vorversuch sehr unterschiedliche miR-205 Expressionslevel nachgewiesen werden (siehe 4.2.5). Anschließend wurden diese Versuche mit dem Inhibitor-Molekül in den Zelllinien mit endogener miR-205 Expression (TCC-SUP und KU-19-19) durchgeführt und ebenfalls nach der optimalen Konzentration gesucht. Alle Transfektionen erfolgten als Doppelansatz. Die Messungen der miRNA wurden in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Normalisierung der gewonnenen miR-205 Werte wurden zusätzlich die Expressionslevel der ubiquitär exprimierten U6 für jeden Ansatz bestimmt.

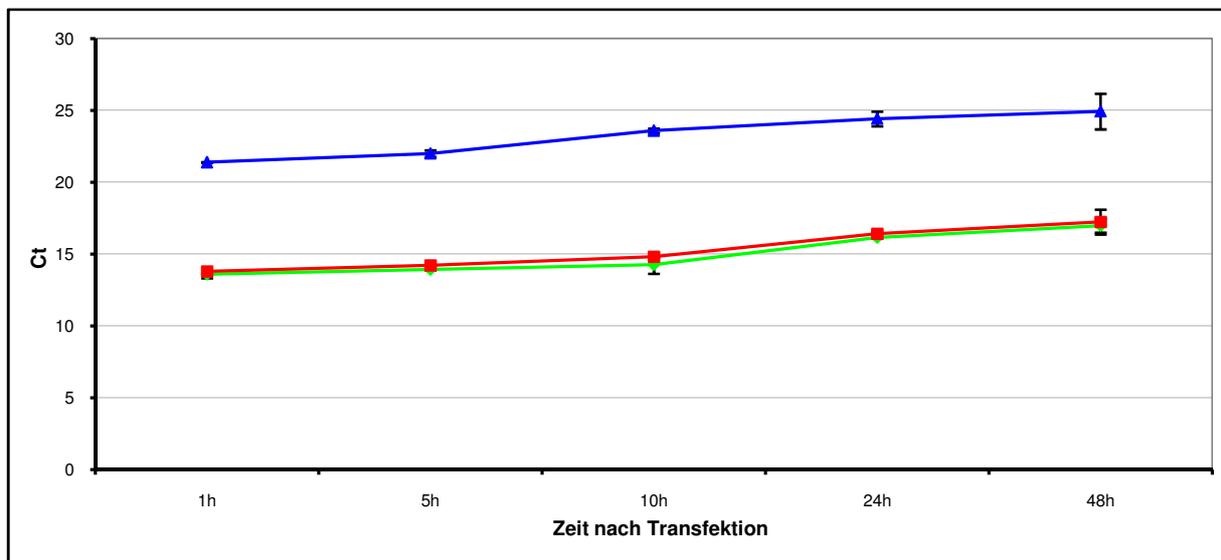


Abb. 23: MiR-205 Expressionslevel in HEK-293 Zellen nach Transfektionen mit verschiedenen Konzentrationen der Pre-miR-205. In allen Ansätzen ist ein erhöhtes miR-205 Level nachweisbar. blau: 0,5 nM eingesetzte miR-205; rot: 5 nM eingesetzte miR-205; grün: 50 nM eingesetzte miR-205.

Die Transfektion von HEK-293 Zellen mit miR-205 Vorläufermolekülen war, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, erfolgreich (siehe Abb. 23). So konnte in allen Ansätzen eine zum Teil sehr ausgeprägte Expression von miR-205 nachgewiesen werden, die nach 1h in allen Fällen am stärksten war und in den nachfolgenden Messungen mehr oder weniger kontinuierlich abnahm. Der stärkste Effekt konnte bei einer Konzentration von 50 nM beobachtet werden. So war nach 1 h ein Ct von 13,6 nachweisbar, welcher sich im Laufe der nachfolgenden Messungen bis auf einen Ct von 17 absenkte. Die künstlich eingeführte miRNA war dementsprechend sehr stabil, über viele Stunden hinweg nachweisbar und damit höchstwahrscheinlich auch aktiv in den transient transfizierten Zellen. Die nachgewiesenen miR-205 Expressionslevel, in den mit 5 nM miR-205 Vorläufermolekülen transfizierten HEK-293 Zellen, waren bei allen Messungen etwa gleich stark im Vergleich zu den 50 nM. So lagen die Ct-Werte nach 1 h bei 13,8 und nach 48 h bei 17,3 für 5 nM eingesetztes miR-205 Vorläufermolekül. Eine deutlich geringere Menge an reifer miRNA konnte in den Zellen nachgewiesen werden, die mit 0,5 nM miR-205 transfiziert wurden. In diesem Ansatz konnte eine Stunde nach Transfektion ein Ct von 21,4 und nach 48 h ein Ct von 24,9 nachgewiesen werden. Als optimale Konzentration für weitere *in vitro* Experimente erwies sich damit eine Konzentration von 5 nM miR-205 Vorläufermolekül. Eine höhere Konzentration brachte nur noch geringfügige Steigerungen in der Menge nachweisbarer reifer miRNA. Nicht in Abb. 23 dargestellt ist die parallel dazu durchgeführte Mock-Transfektion von HEK-293 Zellen. Für diese Ansätze konnte in den durchgeführten Messungen weiterhin keine miR-205 Expression nachgewiesen werden, ein Einfluss der Transfektionsprozedur konnte also ausgeschlossen werden. Die detaillierten Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt.

#### 4.2.8.2 Transfektionsoptimierung für Karzinomzelllinien

Nach diesen ersten Optimierungen für die Zelllinie HEK-293 sollte im Weiteren überprüft werden, ob auch eine Transfektion der Karzinomzelllinien mit dem miR-205 Vorläufermolekül möglich ist. Ebenfalls sollte untersucht werden, in wieweit es in den Zelllinien KU-19-19 und TCC-SUP möglich ist, durch das Einbringen eines Inhibitor-Moleküls, die Menge an endogen vorhandener miR-205 zu reduzieren. Für diese Ansätze erfolgte jeweils nur eine einmalige Messung der miRNA-Expressionsstärken 24 h nach der Transfektion.

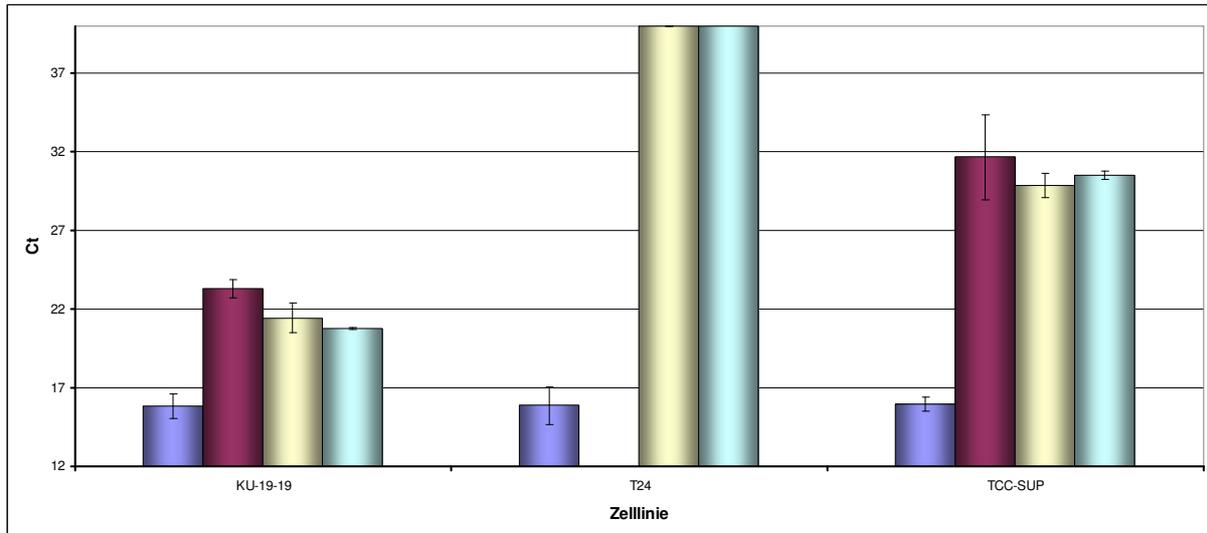


Abb. 24: MiR-205 Expressionslevel 24h nach Transfektion in drei verschiedenen Zelllinien. dunkelblau: Pre-miR-205 transfizierte Zellen; rot: Anti-miR-205 transfizierte Zellen; gelb: Mock-transfizierte Zellen; hellblau: untransfizierte Zellen.

Das erfolgreiche Einbringen des miR-205 Vorläufermoleküls konnte in allen drei Karzinomzelllinien nachgewiesen werden (siehe Abb. 24). So wurde in allen Ansätzen 24 h nach der Transfektion ein signifikanter Anstieg der Expression gemessen, die Ct-Werte lagen in allen Fällen bei ~15 Ct. Dabei war es unerheblich, ob in den Zellen eine endogene miR-205 Expression nachgewiesen werden konnte (TCC-SUP und KU-19-19) oder nicht (T24). Die hier ermittelten Ct-Werte entsprachen zudem den Werten der Messungen 24 h nach Transfektion mit 5 bzw. 50 nM Pre-miRNA in HEK-293 Zellen. Es schien sich bei diesen Konzentrationen an reifer miR-205 um maximal zu erreichende Werte zu handeln, die aber in jedem Fall deutlich über den Mengen liegen, die natürlicherweise in Zellen vorkommen. In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, in wieweit es möglich ist, endogen vorkommende miRNAs durch das Einbringen von spezifischen Anti-miRNAs, zu inhibieren. Sowohl TCC-SUP als auch KU-19-19 zeigten 24 h nach der Transfektion mit 5 nM Anti-miR-205 nur äußerst geringe Effekte, die nicht unbedingt auf die eingebrachte LNA zurückgeführt werden können. So wurde in KU-19-19 Zellen ein Ct von 23,3 nach der Transfektion gemessen, während in den untransfizierten Zellen ein Ct von 20,8 vorlag. Dies entsprach einen Unterschied um das 5,7-fache, was sich im Rahmen von natürlichen bzw. Messschwankungen bewegt. Das gleiche lag für die TCC-SUP Zellen vor, in denen eine Differenz um das 2,3-fache nachgewiesen werden konnte. In den nachfolgend durchgeführten Versuchen wurde aus diesem Grund versucht, mit

einer größeren eingesetzten Menge an Anti-miR-205 (50 nM) einen eindeutigeren Effekt zu erzielen. Eine tabellarische Darstellung der Ergebnisse ist im Anhang aufgeführt.

#### 4.2.9 Regulation von miRNA-Expressionsleveln durch differentielle miRNA-205-Expression (miRNA-regulierte miRNA-Expression)

##### 4.2.9.1 Änderungen von miRNA-Expressionsleveln nach miRNA-205 Transfektion

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist wenig darüber bekannt ob und wenn ja in wieweit miRNAs sich gegenseitig regulieren können. Solche regulatorischen Mechanismen sind auf der mRNA-Ebene bekannt und weit verbreitet. Für einige mRNAs konnten zudem autoregulatorischen Mechanismen nachgewiesen werden. In allen Fällen dient dieser Mechanismus der Aufrechterhaltung des homöostatischen Systems in der Zelle. Dadurch soll verhindert werden, dass es zu einer übermäßigen Expression der mRNA kommt.

Um eine eventuelle miRNA-vermittelte miRNA-Regulation nachzuweisen, wurden die Expressionslevel von 157 miRNAs der Zelllinie HEK-293 mittels qRT-PCR ermittelt (siehe 4.2.5). Anschließend erfolgte die Transfektion der Zellen mit 5 nM des miR-205 Vorläufer-Moleküls oder des Scramble-Moleküls. Nach 24 bzw. 48 h wurden aus den transfizierten Zellen Gesamt-RNA isoliert und die Expressionslevel der 157 miRNAs erneut bestimmt. Alle Experimente erfolgten in einer Dreifachbestimmung. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen wurden anschließend mittels der ubiquitär exprimierten miR-16 normalisiert.

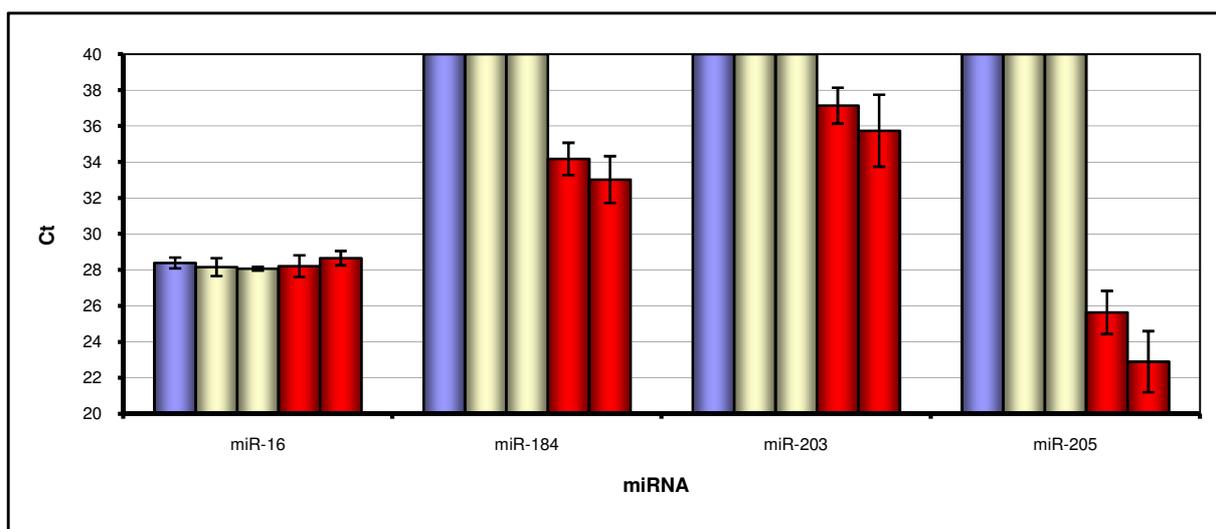


Abb. 25: Differentiell exprimierte miRNAs nach miR-205-Transfektion von HEK-293 Zellen. MiR-184 und miR-203 zeigen eine signifikant stärkere Expression 24 und 48 h nach miR-205-Transfektion. Die Expressionslevel der beiden miRNAs bleibt dagegen bei der Scramble-Transfektion gleich. Die ubiquitär exprimierte miR-16 zeigt ein konstantes Expressionslevel in allen Ansätzen. Blau: untransfiziert, gelb: Scramble-transfiziert, rot: miR-205-transfiziert; linker Balken: Messung nach 24h, rechter Balken: Messung nach 48 h.

Beim Vergleich der miRNA-Expressionsdaten zeigte sich eine deutlich stärkere Expression der miR-205 in den entsprechend transfizierten Zellen. Die Transfektionen konnten also erfolgreich angesehen werden. Der Ct-Wert 24 h nach Transfektion betrug im Durchschnitt 25,6 und nach 48 h 22,9. Der größte Teil der untersuchten miRNAs zeigte nach der Transfektion mit miR-205 keine Änderungen in der Expressionsstärke. Stellvertretend dafür ist die miR-16 dargestellt, die in allen Ansätzen einen Ct von ~28 zeigte. Für die nachfolgende detaillierte Betrachtung wurde, trotz der geringen miR-16 Unterschiede, eine Normalisierung durchgeführt. Nur für miR-203 und miR-184 konnte anschließend eine signifikante Heraufregulation der Expression nach miR-205 Transfektion nachgewiesen werden. Diese betrug für die miR-184 nach 24 h 5,8 und nach 48 h 7 Ct im Vergleich zu den untransfizierten bzw. Scramble-transfizierten Zellen. Dies entspricht einer Änderung um mehr als das 55-fache bzw. sogar um mehr als das 128-fache. Für die miR-203 konnte eine Differenz von 2,8 Ct nach 24 h und von 4,2 Ct nach 48 h nachgewiesen werden. Dies entspricht immerhin auch einer Änderung um das 7-fache nach 24 h und um das 18-fache nach 48 h in den transfizierten HEK-293 Zellen. Einen Einfluss auf die miRNA-Expressionslevel durch die Transfektionsprozedur konnte durch den Einsatz des Scramble-Moleküls ausgeschlossen werden, welches keine signifikanten Unterschiede in der miRNA-Expressionsstärke im Vergleich zu untransfizierten Zellen erzeugte. Im Anhang sind die vorliegenden Ergebnisse in Tabellenform dargestellt.

#### 4.2.9.2 Analysen von miRNA-184 und miRNA-203

Da die transiente miR-205 Transfektion der HEK-293 Zellen einen sehr spezifischen Effekt nur auf miR-184 und miR-203 hatte, während die restliche untersuchten miRNAs weitestgehend unbeeinflusst blieben, sollte in nachfolgenden computergestützten Analysen eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen gefunden werden.

Die miR-203 pri-miRNA ist als Monocystron auf Chromosom 14 in einem intergenischen Bereich lokalisiert. Ursprünglich wurde sie durch computergestützte Methoden aufgrund konservierter Domänen in Mäusen und *Fugu rubripes* vorhergesagt<sup>42</sup>. Die Expression konnte in Zebrafischen validiert und von Landgraf *et al.* letztlich auch im Menschen nachgewiesen werden<sup>178</sup>. Auffällig war, dass miR-203 schon beim Vergleich der Expressionsprofile von Tonsillen und Lymphknoten, neben der miR-205, den größten Unterschied zwischen den beiden Geweben zeigte, obwohl sie nicht auf demselben Chromosom lokalisiert sind (siehe 4.2.1). So ist das Gen von miR-205 auf Chromosom 1 zu finden.

Die pri-miRNA von miR-184 ist als Monocystron auf Chromosom 15 in einem intergenischen Bereich lokalisiert. Sie wird also unabhängig von miR-205 oder miR-184 von der Pol II abgelesen. Ursprünglich erfolgte eine Vorhersage dieser miRNA durch Sequenzhomologien mit der in Mäusen verifizierten miR-203<sup>35</sup>, später konnte sie auch im Menschen nachgewiesen werden<sup>178</sup>.

Nach den vorliegenden Ergebnissen stellte sich die Frage, wie die Regulation dieser beiden miRNAs durch miR-205 erfolgte? Da alle drei pri-miRNAs auf verschiedenen Chromosomen liegen, konnte eine Änderung in der gemeinsamen Ablesung ausgeschlossen werden. Eine Alternative dazu wäre, dass miRNAs sich durch die Bindung an die 3'UTRs anderer miRNAs gegenseitig regulieren. Für diese Variante spricht, dass das Ablesen der pri-miRNAs durch die Pol II erfolgt. Bei dieser Polymerase handelt es sich um die gleiche Unterart, welche auch für das Ablesen der Protein-codierenden RNAs zuständig ist. Die grundsätzliche Struktur der pri-miRNAs entspricht also der der mRNAs und diese werden von miRNAs reguliert. Wenn diese direkte Regulation der Fall wäre, müsste sich in der putativen 3'UTR der pri-miRNAs mindestens eine Bindestelle für miR-205 vorhersagen lassen. Problematisch war, dass wenig über UTR-Strukturen in pri-miRNAs bekannt ist, eine Vorhersage also äußerst schwierig ist. Um trotzdem eine Analyse der mutmaßlichen 3'UTR vorzunehmen, wurde ein 1000 bp-Bereich stromabwärts der pri-miRNA-Sequenzen von miR-184 und miR-203 auf *seed*-Sequenzen für miR-205 hin rechnergestützt untersucht. In beiden Fällen war diese Suche erfolgreich. So konnten in der „3'UTR“ der humanen miR-184 zwei *seed*-Sequenzen von miR-205 nachgewiesen werden (siehe Abb. 26) und in der entsprechenden Analyse für die humane miR-203 eine (siehe Abb. 27). Eine direkte Regulation beider miRNAs durch miR-205 ist also theoretisch möglich.

```

CGGGGAGGGCTCGCCGGGAAATCAAACGTCCATTTACATCTTGTCTGCAAAGCTTCATCAAACCTTCTTTGC
CGGCCAGTCACGTCCCCTTATCACTTTTCCAGCCCAGCTTTGTGACTGTAAGTGTTGGACGGAGAACT
GATAAGGGTAGGTGATTGACACTCACAGCCTCCGGAACCCCCGCGCCGCCTGCACTTGCCTGATGGGGA
AAACCTGGCGTTCCCCGCTCTGGGTGCCCGAGGACAGCGGGGATTCCAGGAGGAGACCTTGGGCATAGGGGGC
CCAGGTATGCGCCCCCTGCCTGAGGATGCTGGGGTAGCCTTTGTGTTTTGTCACTGAGATCTCCACTTTGCTT
ATTCAAAATGTGCTCTCTGCGACTGGGTTTAGGGTCTCCCCTTGAGAAAAGCGGTGGGTGGTTGGTGAGGGA
AGGGGGCTTATTCCACAGACTTCTTTATAAGGTGAATAAAAGGGGTATAGGACTTTTTGGAATTTTAGGTACTC
TTGCTTAAAAAAGGGGAGAGCAGGAATTTCCGTCTGATTTGAGGGAAAGTCCCTTTCCAGACATTTT
CTTCAGCTGACAGCTACTACCAAATGCTTTTGTCTTTTTCGGTTTATAGGAACCATGTGCTGAGACAGAAG
TTTCATGACTCTAACTAACTTATATTCTATTACATTAAGATGGTTATTTATTACGTTGTTGATTGAGAATG
ATCTTTTATAACTCATAATTACTTATACCAAATCAAACCTCAATAAATGTCTTAATTGGCACATTGCAGTAACG
GACTGACACATAAGCAAGTCTATACACCTGTGTGTAAGATGTAAAACCACAGATAAAAAATCCTGTAACCTAC
AAATGCTTCTATTTCTGGAATGTGAATACAGATTAACATGCAATGGATTGCATCTCAGCTGAACAGGTACTT
TTTTCTTTTCTTTTCTGCAATTAATATTATGATTTTACTTAAAGAGTAAATACAGTTTTAAAGTTAATGA
AGGTGGTAGATGAACACAGTGGTTCAGCCTTAGCTGCTTGTGGAGTCACCTGGGAGTTTTGAAGGG
TCCTGATGCATGGCAAATTACATCAGAATCTTCAGGATGTGGCTGGGCAAGAGTAGTTTGGAGAACCGTGCAA
AAATAA

```

Abb. 26: Sequenz von hsa-miR-184. In der putativen 3'UTR sind zwei *seed*-Sequenzen für eine miR-205 Bindung (grün) nachweisbar. rot: Sequenz der pri-miRNA von miR-184; fett: Sequenz der reifen miR-184.

```

CCCCGGGATCCGCAGGCGACGCGGGCGGTCCAAGGGCGTCGGGGCTCCTCTCTCCGCAGCTCGGCGAACCG
ACGGTGTGGGGACTCGCGCGCTGGGTCCAGTGGTCTTAACAGTTCAACAGTTCTGTAGCGCAATTGTGA
AATGTTTAGGACCACTAGACCCGGCGGGCGCGGCGACAGCGACGGAGCGTCCCACGCGCGGCTGG
AGTCAGAGTCACAGTCAGGGGTGCGCCGGCGACCAATCCAGGGGAGCCACGGACCGGCTCCGCGCTCCAGGT
CGGCCGCCCCATGCGCCGCGCCCCGAGTCCCAGGGCCTGGCTGGCTCCACCTGCTGCCAGGGAAGACCCTC
GGCCGGAGAGCCAAGTGTGCTGCTGGGAGGTGGCCGGGCGTGGCCGGCTGTGCTGTGGGAACCGTGGGTGGGG
GCGCGCTGGGTGGCCACGCTCCTGGCGCGCTGCCGGCTGGAGACGCCGCCGCCGCCCTTTGCACCCGAG
GGCCCGCACCTCGAAACTCCGTGGAATTCAGCGAGGAACCTGGCGGTGGGCCCGTAGGGTTGAGGAGCGCTC
CTTGCCCTGGGCTTCTGGGAGCTGCCCATCAGGCTGCCGGCAGCCGACCCCTGCTGGGCGGCCGATGGTTCC
CGCTGCCGGCTCCCCGGAGCGTCTCCACTCACTGAGGCCCTAGGGAGCGCTGCGCGGCTCCTACGAGTGCGCG
CTAAACTCGTGAAGGACCTCGAGGCACAGGAACCTGGGGGTGGGGAGGAAGTTTGCACTACACCCAGGT
AGAGGAGAAGCGGCGCCCATGATGACAGGTGCCTTCGCCGGAGCCTCCCTGGAACCTCGTGGTAGCTAGCGCC
CACAGGAGAGGTGTGCGCGTCAATCTGCGTGTGAAGCCCCGGGCGGCCCTGGGAGGGACTCAGCAAAGGGTCCG
AATCTGTCCCCACCTCCAGCCAGGGGCGGGGCTTTCTGCTTGGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TGGAGGGTCCCCCTCCAGTCCCCACCTCCTCACCCAGTGTTTAGAGAGCTGCGGGGAGTCTGGGAGATGGGT
CAGACAGGCTGGGTTTGGAGCCTGCTAGGGTGGCCTTGGGCCAGTCACCTGCCCTCTCTGAGCCCGACCTGC
ACACATAGGGGGTTGATGTGAGGAGACAGG

```

Abb. 27: Sequenz von hsa-miR-203. In der putativen 3'UTR ist eine *seed*-Sequenz für eine miR-205 Bindung (grün) nachweisbar. rot: Sequenz der pri-miRNA von miR-203; fett: Sequenz der reifen miR-203.

#### 4.2.10 Computergestützte Zielgenanalyse von miRNA-205

Nachdem in den vorherigen Untersuchungen primär beschrieben wurde, wie die miR-205 Expressionsmuster in verschiedenen Geweben verteilt sind, sollte in den nachfolgenden Untersuchungen näher auf die Funktion dieser speziellen miRNA eingegangen werden. Als erster Anhalt diente dabei die computergestützte Analyse von putativen Zielgenen der miR-205. Unter der Vielzahl von Programmen im Internet wurde sich im Weiteren für die Nutzung der PicTar-Datenbank (<http://pictar.bio.nyu.edu>) entschieden. Die Vorhersagen basieren dabei auf Untersuchungen von Krek *et al.* für Vertebraten und Grün *et al.* für Fliegen<sup>108,179</sup>.

Für die miR-205 wurden von PicTar in einer ersten Analyse 274 putative Ziele vorhergesagt. Da in dieser Liste von vielen Genen allerdings mehrere Transkriptvarianten aufgelistet waren, reduzierte sich die Anzahl der eigentlichen mutmaßlichen Ziel-mRNAs auf 191. Um eine Abschätzung über eine eventuelle Funktion der miR-205 zu erhalten, wurde eine allgemeine Einteilung der putativen Zielgene in verschiedene funktionelle Gruppen vorgenommen. Dabei fanden sich relativ viele Gene, die in Zellzyklus (24), Apoptose (13), Proliferation (7), Wachstum (5) und Zellteilung (7) involviert sind. Fasst man diese Gruppen zusammen, haben ~30% aller möglichen Ziel-mRNAs mit der Regulation des Überlebens der Zelle zu tun (siehe Abb. 28). Es besteht damit die Möglichkeit, dass auch die miR-205 in diese Regulation involviert ist und regulatorische Funktionen in Epithelzellen übernimmt.

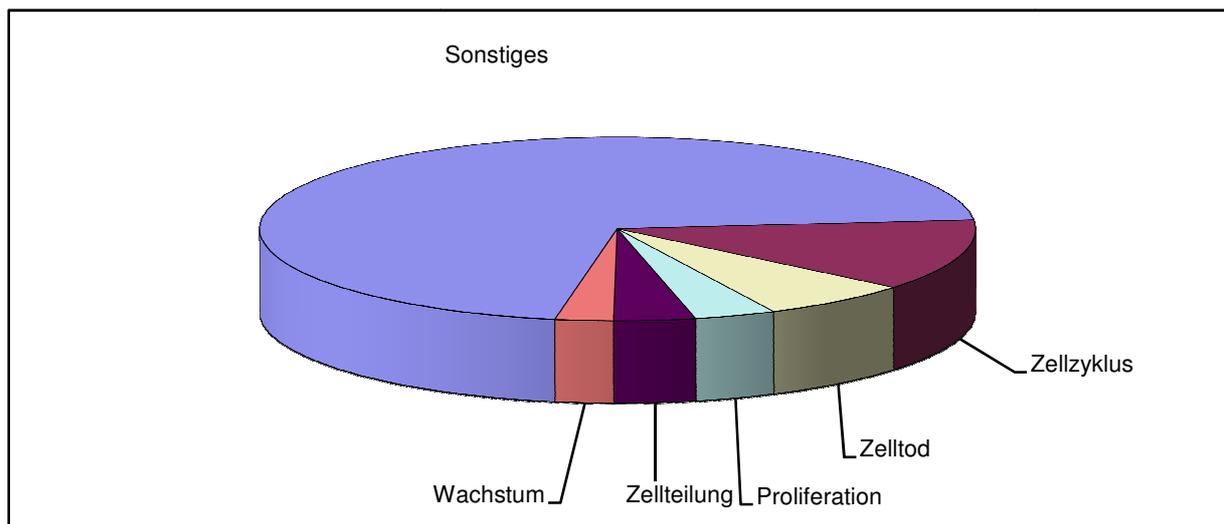


Abb. 28: Funktionelle Gruppierung der Ziel-mRNAs von miR-205. Etwa 30% der mutmaßlichen Zielgene haben Einfluss auf Wachstum, Zellteilung, Proliferation, Zelltod und Zellzyklus.

#### 4.2.10.1 Putative Zielgene von miRNA-205 mit regulatorischen Funktionen während des Zellzyklus

Die Auflistungen der mutmaßlichen Zielgene in der PicTar-Datenbank erfolgen nach bestimmten Wertigkeiten, wobei die Anzahl und Lokalisation der *seed*-Sequenzen in der 3'UTR, die phylogenetische Konservierung der Bindestellen zwischen orthologen Genen sowie die freie Energie der Faltung des miRNA:mRNA-Duplexes bei der Vergabe der Reihenfolge von zentraler Bedeutung sind. Aus diesem Grund ist die Wahrscheinlichkeit, dass Zielgene, die oben in der Liste aufgeführt sind, eher von der entsprechenden miRNA reguliert werden, als die weiter unten, deutlich größer. In jedem Fall ist es aber notwendig, diese bioinformatisch gewonnenen Ergebnisse experimentell zu validieren.

Die Analyse von putativen Zielgenen der miR-205 ergab, dass relativ viele Gene, die in die Regulation des Zellzyklus involviert sind, weit oben in der Auflistung der PicTar-Datenbank erscheinen. Dies unterstützte die Theorie, dass die miR-205 einen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus hat. Aus diesem Grund wurde sich im Weiteren auf Analysen von möglichen Zielgenen beschränkt, die in die Kontrolle des Zellzyklus involviert sind. In Tab. 13 sind acht mutmaßliche Zielgene aufgeführt, die nachfolgend näher untersucht werden sollten, sowie deren wichtigste Funktionen in der Zelle. Dabei handelte es sich um ARTS (Septin 4; Sept4), PHB (Prohibitin), TP53BP2 (Tumorprotein p53, Bindeprotein 2), SMAD1 (SMAD Familienmitglied 1), E2F1 (E2F Transkriptionsfaktor 1), E2F5 (E2F Transkriptionsfaktor 5) und ERBB3 (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3*). Sie wurden primär aufgrund ihrer Position in der PicTar-Datenbank ausgewählt und haben in allen Fällen regulatorische Funktionen während des Zellzyklus.

Tab. 13: Bioinformatische Analyse von putativen Zielgenen der miR-205 mit regulatorischen Funktionen während des Zellzyklus. Die Anzahl der Sequenzen bezieht sich jeweils auf den Menschen.

Zielgen	PicTar-Position (Wert)	Anzahl miR-205 Sequenzen	Anzahl andere miRNAs	Funktionen / involviert in
ARTS	1 (12,60)	4	4	Zellzyklus; Cytokinese; Regulation der Apoptose
PHB	7 (8,94)	2	4	DNA-Replikation; Histon-Deacetylisierung; negative Regulation der Zellproliferation; negative Regulation der Transkription; Regulation der Apoptose; Signaltransduktion
E2F1	74 (4,24)	2	8	G1-Phase der Mitose; Apoptose; Zellzyklus; Zellproliferation; Hirnentwicklung; Regulation der der Transkription durch RNA-Polymerase II Promotor; DNA-abhängige Regulation der Transkription;
E2F5	103 (3,65)	1	28	Organmorphogenese; DNA-abhängige Regulation der Transkription
ERBB3	105 (3,60)	1	1	Schwann-Zellen Differenzierung; craniale Nervenentwicklung; Herzentwicklung; negative Regulation der Zelladhäsion; negative Regulation der Neuronenapoptose; negative Regulation der Sekretion; negative Regulation der Signaltransduktion; positive Regulation der Phosphoinositid-3-Kinase-Kaskade; Protein-Aminosäure-Phosphorylation; Regulation der Zellproliferation; Transmembran-Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinase-Signalweg; Wundheilung
TP53BP2	127 (3,31)	1	0	Induktion der Apoptose; negative Regulation des Zellzyklus; Signaltransduktion
SMAD1	213 (2,36)	1	10	BMP-Signalweg; MAPKKK-Kaskade; embryonale Musterspezifikation; Gametenbildung; homöostatische Prozesse; Hirnentwicklung; negative Regulation der Zellproliferation; positive Regulation der Transkription durch RNA-Polymerase II Promotor; DNA-abhängige Regulation der Transkription; Signaltransduktion; TGF $\beta$ -Rezeptor-Signalweg

#### 4.2.10.2 Weitere putative Zielgene mit und ohne direkte miR-205 Regulation

Zusätzlich zu den acht oben aufgeführten mutmaßlichen Zielgenen, fanden sich während der bioinformatischen Suche noch drei weitere auffällige bzw. interessante Gene. Dabei handelte es sich um DGCR8, PKCB und INPPL1 (siehe Tab. 14).

DGCR8 (DiGeorge Syndrom kritische Region Gen 8) ist neben Drosha einer der zentralen Bestandteile der frühen miRNA-Reifung<sup>52</sup>. Laut computergestützter Analyse besitzt die

3'UTR der mRNA neben der Bindestelle für miR-205 nur noch eine weitere für miR-320. Es handelt sich damit also um einen vielversprechenden Regulations-Kandidaten von miR-205.

Als mögliche andere Zielgene wurden die Protein Kinase C beta 1 (PKCB1, PRKCB1) und INPPL1 (*inositol polyphosphate phosphatase-like 1*) herausgefiltert. Die Untersuchungen zur miRNA-regulierten miRNA-Expression ergaben nur für miR-184 und miR-203 signifikante Änderungen in der Expression nach Transfektion mit miR-205 (siehe 4.2.9). Bei bioinformatischen Analysen dieser beiden miRNAs mittels der PicTar-Datenbank, fielen besonders PKCB und INPPL1 auf. PKCB besitzt laut Vorhersage zwei Bindestellen für miR-203 und eine für miR-184, INPPL1 je eine für miR-205 und miR-184. Da es von Interesse war herauszufinden in wieweit miRNAs auch indirekt, durch die Regulation anderer miRNAs, Zielgene regulieren können, wurde PKCB in die weiteren Analysen eingeschlossen. Wenn es möglich wäre, eine indirekte Regulation der PKCB-Expression durch miR-205 nachzuweisen, würde es sich dabei um eine Erweiterung der bekannten miRNA-Funktionen handeln, die Komplexität der bekannten Funktionen deutlich erhöhen.

Tab. 14: Bioinformatische Analyse von putativen Zielgenen mit und ohne direkte miR-205 Regulation. Die Anzahl der Sequenzen bezieht sich jeweils auf den Menschen.

Zielgen	PicTar-Position (Wert)	Anzahl miR-205 Sequenzen	Anzahl andere miRNAs	Funktionen / involviert in
INPPL1	118 (3,37)	1	1	Zelladhäsion; Immunantwort; Phosphat-metabolische Prozesse
DGCR8	219 (2,30)	1	1	primäre miRNA-Prozessierung
PKCB			4	intrazelluläre Signalkaskaden; Protein-Aminosäure-Phosphorylation

#### 4.2.11 Einfluss der miRNA-205 auf die Zahl lebender Zellen

Nachdem die computergestützten Analysen putativer Zielgene der miR-205 ergeben hatten, dass ein relativ großer Teil der Gene in die Regulation des Zellzyklus involviert ist, sollte im Weiteren untersucht werden, in wieweit es möglich ist das Zellwachstum durch eine Misexpression der miR-205 zu ändern. Dazu wurden von vier verschiedenen Zelllinien (HEK-293, T24, TCC-SUP und KU-19-19) MTT-Assays durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein System zur Messung des Metabolismus und der Vitalität von Zellen in einem Ansatz. Nur den lebenden Zellen ist es möglich, mittels der mitochondrialen Dehydrogenase das eingebrachte

MTT-Substrat in ein Formazan-Produkt umzusetzen. Dieses kann anschließend durch die Messung der OD quantifiziert werden. Ändert sich die Anzahl der lebenden Zellen in einem behandelten Ansatz im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen, kann man somit Rückschlüsse auf die Funktion der miR-205 in den Zellen ziehen.

#### 4.2.11.1 Untersuchung von HEK-293 Zellen

In einem ersten Versuch wurden HEK-293 Zellen zum einen mit 5 nM des miR-205 Vorläufermoleküls und zum anderen mit 50 nM der Anti-miR-205 transient transfiziert. Als Ausgangswerte wurden 2500, 5000 und 10000 Zellen eingesetzt. Anschließend erfolgten Messungen der OD 24, 48 und 72 h nach den Transfektionen. Die so gewonnenen Werte wurden mit parallel dazu durchgeführten Mock-Transfektionen mit den gleichen Ausgangszellzahlen in ein Verhältnis gesetzt. Dadurch waren Änderungen in der Anzahl lebender Zellen und damit des Zellwachstums nachweisbar. Alle Messungen erfolgten in einem 8-fachen Ansatz. Um die Signifikanz der so gewonnenen Ergebnisse zu prüfen, wurde anschließend ein gepaarter t-Test mit zweiseitiger Verteilung durchgeführt.

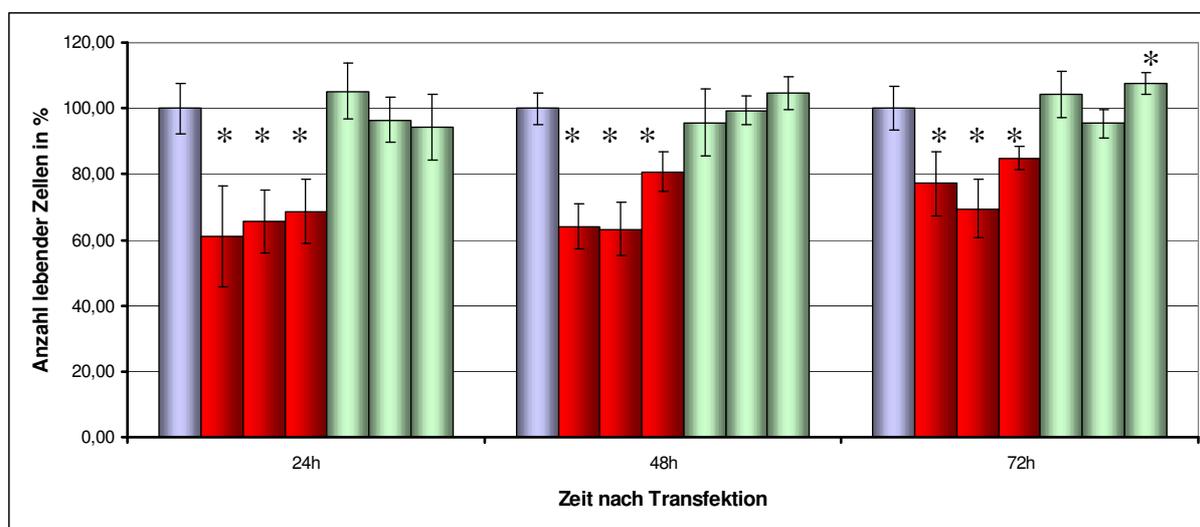


Abb. 29: Ergebnisse des MTT-Assays von HEK-293 Zellen. Nach Überexpression der miR-205 ist eine geringere Anzahl lebender Zellen nachweisbar. Die Transfektion mit der Anti-miR-205 führt in den meisten Fällen zu keiner signifikanten Änderung der Zellzahl. blau: Mock-transfizierte Zellen; rot: Pre-mir-205 transfizierte Zellen; grün: Anti-miR-205 transfizierte Zellen; linker Balken: 2500 Zellen; mittlerer Balken: 5000 Zellen; rechter Balken: 10000 Zellen; Stern: signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) im t-Test.

In den durchgeführten Messungen der Anzahl lebender Zellen ergaben sich für HEK-293 Zellen nach den Transfektionen mit dem miR-205 Vorläufer deutliche Differenzen zwischen den verschiedenen Ansätzen (siehe Abb. 29). So wurden sowohl bei den ursprünglich eingesetzten 2500 Zellen, als auch bei 5000 und 10000 Zellen deutliche Minderungen in der Zellzahl gemessen. 24 h nach den Transfektionen konnten zwischen 61,0 und 68,6% lebende Zellen in den mit dem miR-205 Vorläufermolekül transfizierten Ansätzen, im Vergleich zu den Mocktransfizierten, nachgewiesen werden. Nach 48 h waren Werte zwischen 63,3 und 80,7% nachweisbar, nach 72 h zwischen 69,5 und 84,9%. Unterzog man die gewonnenen Daten einem gepaarten t-Test mit zweiseitiger Verteilung konnten für alle Ansätze und Zeitpunkte signifikante Unterschiede (p-Werte zwischen 0,0001 und 0,02) zwischen miR-205 und Mocktransfizierten Zellen nachgewiesen werden. In den meisten mit Anti-miR-205 transfizierten Ansätzen zeigte sich nur eine geringe bis keine Veränderung in der Anzahl lebender Zellen. So waren nach 24 h Werte zwischen 94,3 und 105,2% Zellen im Vergleich zu den Mocktransfektionen nachweisbar. Auch nach 48 h lagen die Messergebnisse mit 95,6 bis 104,7% in diesem Rahmen. Diese Werte bestätigten sich ebenfalls nach 72 h mit 95,5 bis 107,6%. Den Test auf Signifikanz der gemessenen Unterschiede bestand nur der Ansatz mit 10000 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit  $p < 0,002$ . Alle Ergebnisse sind im Anhang in tabellarischer Form aufgeführt.

#### 4.2.11.2 Untersuchung von T24 Zellen

Nachdem die Überexpression von miR-205 in HEK-293 Zellen einen signifikanten Effekt auf die Zahl lebender Zellen zeigte, sollte in weiteren Versuchen untersucht werden ob sich dies in anderen Zelllinien bestätigen lässt. Dazu wurden im Folgenden die Karzinomzelllinien T24, KU-19-19 und TCC-SUP genutzt. Da es sich bei miR-205 um eine hauptsächlich im Epithel exprimierte miRNA handelt, befindet man sich mit der Wahl dieser Zelllinien näher am natürlichen System und kann bei Versuchen Reaktionen erwarten, die denen im Organismus nahe kommen. Die Untersuchungen wurden zudem mit allen drei Zelllinien durchgeführt, da in diesen sehr unterschiedliche Mengen endogener miR-205 Expression nachgewiesen wurden (siehe 4.2.5).

Im ersten Ansatz wurden T24 Zellen sowohl mit der Pre- als auch mit der Anti-miR-205 transient transfiziert. Die Ansätze und Messungen erfolgten wie oben für die HEK-293 Zellen beschrieben.

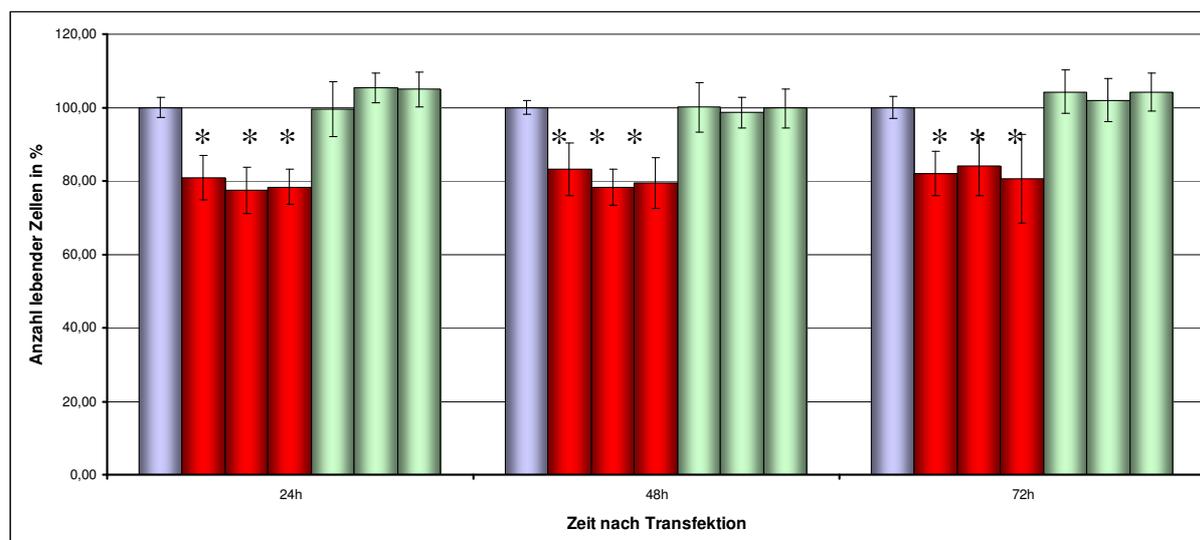


Abb. 30: Ergebnisse des MTT-Assays von T24 Zellen. Nach Überexpression der miR-205 ist eine geringere Anzahl lebender Zellen nachweisbar. Die Transfektion mit der Anti-miR-205 führt zu keiner signifikanten Änderung der Zellzahl. blau: Mock-transfizierte Zellen; rot: Pre-miR-205 transfizierte Zellen; grün: Anti-miR-205 transfizierte Zellen; linker Balken: 2500 Zellen; mittlerer Balken: 5000 Zellen; rechter Balken: 10000 Zellen; Stern: signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) im t-Test.

Die Messungen der Zahl lebender Zellen in den mit dem miR-205 Vorläufer transfizierten Ansätzen zeigten signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Mock-Transfektionen (siehe Abb. 30). Nach 24 h konnten Werte zwischen 77,4 und 80,9% nachgewiesen werden. Nach 48 h bewegten sich die Messergebnisse zwischen 78,4 und 83,3% und nach 72 h zwischen 80,5 und 84,2%. Bei einem gepaarten t-Test mit zweiseitiger Verteilung konnte in allen Fällen eine Signifikanz (p-Werte zwischen 0,0001 und 0,005) der Unterschiede zwischen miR-205 und Mock-transfizierten Ansätzen nachgewiesen werden. Bei den parallel dazu durchgeführten Transfektionen mit Anti-miR-205 konnten, ähnlich wie bei HEK-293 Zellen, keine signifikanten Unterschiede in der Zahl lebender Zellen nachgewiesen werden. So lagen die gemessenen Werte in allen Ansätzen zwischen 98,6 und 104,9% im Vergleich zur Mock-Transfektion.

#### 4.2.11.3 Untersuchung von KU-19-19 Zellen

In einem nächsten Versuch sollte nun eine Karzinomzelllinie auf ihr Zellwachstum hin untersucht werden, die eine sehr starke endogene miR-205 Expression zeigt. In KU-19-19 Zellen konnte in unbehandelten Zellen ein Ct-Wert von 20,8 für miR-205 nachgewiesen werden (siehe 4.2.5). Aus diesem Grund besteht in diesen Zellen die Möglichkeit neben einer signifikan-

ten Änderung in der Zahl lebender Zellen nach Transfektion mit dem miR-205 Vorläufer auch eine Verschiebung nach Einbringen der Anti-miR-205 nachweisen zu können.

Die Transfektionsansätze und Messungen entsprachen denen wie für HEK-293 Zellen beschrieben.

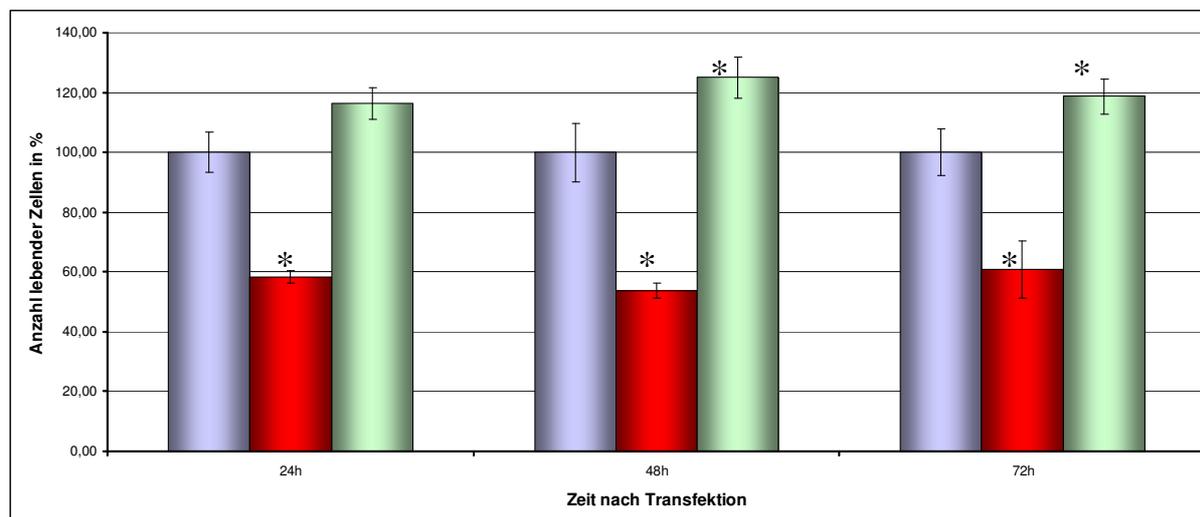


Abb. 31: Ergebnisse des MTT-Assays von KU-19-19 Zellen. Nach Überexpression der miR-205 ist eine geringere Anzahl lebender Zellen nachweisbar. Die Transfektion mit der Anti-miR-205 führt zu einer signifikanten Änderung der Zellzahl nach 48 und 72h. blau: Mock-transfizierte Zellen; rot: Pre-mir-205 transfizierte Zellen; grün: anti-miR-205 transfizierte Zellen; Stern: signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) im t-Test.

Die Ergebnisse der durchgeführten Messungen ergaben für die Ansätze mit 2500 und 5000 ausgesäten Zellen ein sehr inhomogenes und nicht reproduzierbares Bild. Dies war primär auf das sehr ungleichmäßige Wachstum bei einer zu geringen Zellzahl zurückzuführen. Aus diesem Grund fand die Auswertung und Analyse der Messwerte nur für die Ansätze mit 10000 Zellen statt. Nach Transfektion mit der Pre-miR-205 konnte erneut eine geringere Zahl lebender Zellen zu allen drei Messpunkten nachgewiesen werden (siehe Abb. 31). Die Werte lagen zwischen 58,4 und 60,8% im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen. Zusätzlich konnte bei diesem Zelltyp auch eine signifikante Änderung in der Zellzahl nach Transfektion mit der Anti-mir-205 nachgewiesen werden. So lagen die Werte zwischen 116,4 und 125% im Vergleich zu den Mock-Transfektionen. Bei den durchgeführten gepaarten t-Tests mit zweiseitigen Verteilungen konnten, außer in der 24 h Messung nach Anti-miR-205 Transfektion, für alle Ansätze signifikante Unterschiede ( $p$ -Werte zwischen 0,0002 und 0,03) zwischen Pre-/Anti-miR-205 und Mock-transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Eine ausführliche Darstellung ist im Anhang aufgeführt.

#### 4.2.11.4 Untersuchung von TCC-SUP Zellen

Abschließend wurden dieselben Versuche auch noch mit TCC-SUP Zellen durchgeführt. In diesen Zellen ist ein mittleres miR-205 Expressionsniveau nachweisbar (siehe 4.2.5). Dadurch ist eine Verifizierung der in KU-19-19 gewonnenen Ergebnisse zur Änderung der Zahl lebender Zellen nach Anti-mir-205 Transfektion möglich.

Die Transfektionsansätze und nachfolgenden Analysen entsprachen wiederum denen wie für HEK-293 Zellen beschrieben.

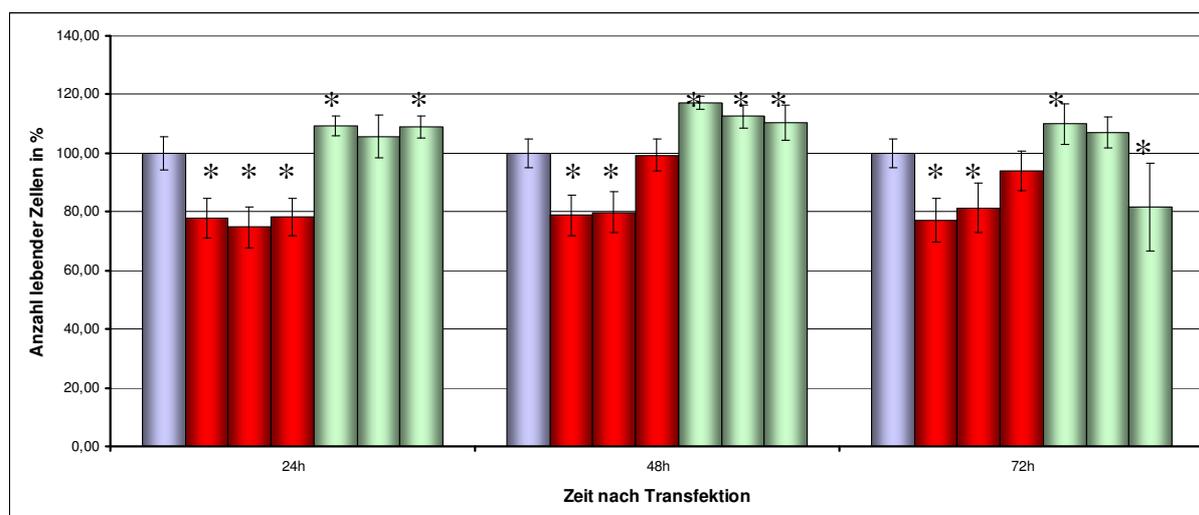


Abb. 32: Ergebnisse des MTT-Assays von TCC-SUP Zellen. Nach Überexpression der miR-205 ist eine geringere Anzahl lebender Zellen nachweisbar. Die Transfektion mit der Anti-miR-205 führt zu in den meisten Ansätzen zu einer signifikanten Änderung der Zellzahl. blau: Mock-transfizierte Zellen; rot: Pre-miR-205 transfizierte Zellen; grün: Anti-miR-205 transfizierte Zellen; linker Balken: 2500 Zellen; mittlerer Balken: 5000 Zellen; rechter Balken: 10000 Zellen; Stern: signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) im t-Test.

Durch das etwas bessere Wachstum der Zellen während der Versuche war es in diesem Fall wieder möglich, die Ansätze mit 2500 bzw. 5000 ausgesäten Zellen auszuwerten. Dafür waren die Werte für die Pre-miR-205 Transfektionen von 10000 Zellen nach 48 und 72 h bzw. die Anti-miR-205 Transfektionen nach 72 h nur noch bedingt auswertbar, da es zu deutlichen Überwachungen in den Wells kam und damit nur noch suboptimale Bedingungen gegeben waren. Die Werte nach den Transfektionen mit dem miR-205 Vorläufermolekül zeigten wiederum Verringerungen in der Zahl lebender Zellen im Vergleich zu den Mock-Transfektionen. Sie lagen zwischen 74,7 und 78,2% 24 h nach Transfektion, zwischen 78,9 und 79,9% nach 48 h und zwischen 77,1 und 81,3% nach 72 h. Alle diese Werte bestanden auch die gepaarten t-Tests mit zweiseitigen Verteilungen (p-Werte zwischen 0,0002 und 0,001); signifikante Un-

terschiede waren also gegeben. In den Ansätzen der mit Anti-miR-205 transfizierten Zellen konnten erneut Steigerungen in der Zahl lebender Zellen im Vergleich zu den Mock-Transfektionen nachgewiesen werden. Sie lagen zwischen 105,7 und 109,1% nach 24 h, zwischen 112,5 und 117,1% nach 48 h und zwischen 107,1 und 109,9% nach 72 h. Die Tests auf Signifikanz der gewonnenen Ergebnisse brachten für alle Zeitpunkte der 2500 Zellen, für 48 h der 5000 Zellen und für alle Zeitpunkte der 10000 Zellen einen positiven Wert (p-Werte zwischen 0,0001 und 0,04). Die tabellarische Auflistung der Ergebnisse ist im Anhang zu finden.

#### 4.2.12 Einfluss der miRNA-205 auf das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen

Die zuvor durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Zahl lebender Zellen nach miR-205 Transfektionen, zeigten jeweils ähnliche Tendenzen sowohl beim Einbringen des Vorläufer- als auch des Anti-miRNA Moleküls in den verschiedenen Zelllinien. So verringerte sich die Anzahl lebender Zellen durch eine miR-205 Überexpression in den meisten Fall signifikant, während sie bei einer Inhibition der endogenen miR-205 anstieg. Nachteil dieser Messungen ist, dass es nicht möglich ist zwischen Änderungen in der Apoptoserate und des Zellzyklus unterscheiden zu können. Um eine genauere Zuordnung der durch MTT-Messungen erhaltenen Ergebnisse zu ermöglichen, war es deshalb notwendig, zwischen den toten und lebenden Zellen in einem miR-205 Transfektionsansatz unterscheiden zu können.

Eine einfache aber gebräuchliche Methode, um zwischen lebenden und toten Zellen in einem Zellkulturansatz zu unterscheiden, ist die Färbung der Zellen mit Trypanblau. Nur lebenden Zellen ist es möglich diesen Farbstoff aktiv aus ihrem Inneren herauszutransportieren. Tote Zellen hingegen zeigen eine deutlich dunkelblaue Färbung, eine grobe Unterscheidung ist dadurch möglich.

Um den Einfluss von miR-205 auf die Zahl toter Zellen in einem Ansatz zu ermitteln, wurden HEK-293 Zellen mit 5 nM des miR-205 Vorläufermoleküls transient transfiziert. In einer Zeitreihe wurden nach 24, 48 und 72 h transfizierte Zellen abgenommen, mit Trypanblau versetzt und die Gesamtzellzahl sowie die Zahl toter Zellen ermittelt. Zu Vergleichszwecken wurden parallel dazu Mock-Transfektionen durchgeführt und zu den genannten Zeitpunkten ebenfalls die Zellen ausgezählt. Alle Transfektionen erfolgten in einem Doppelansatz.

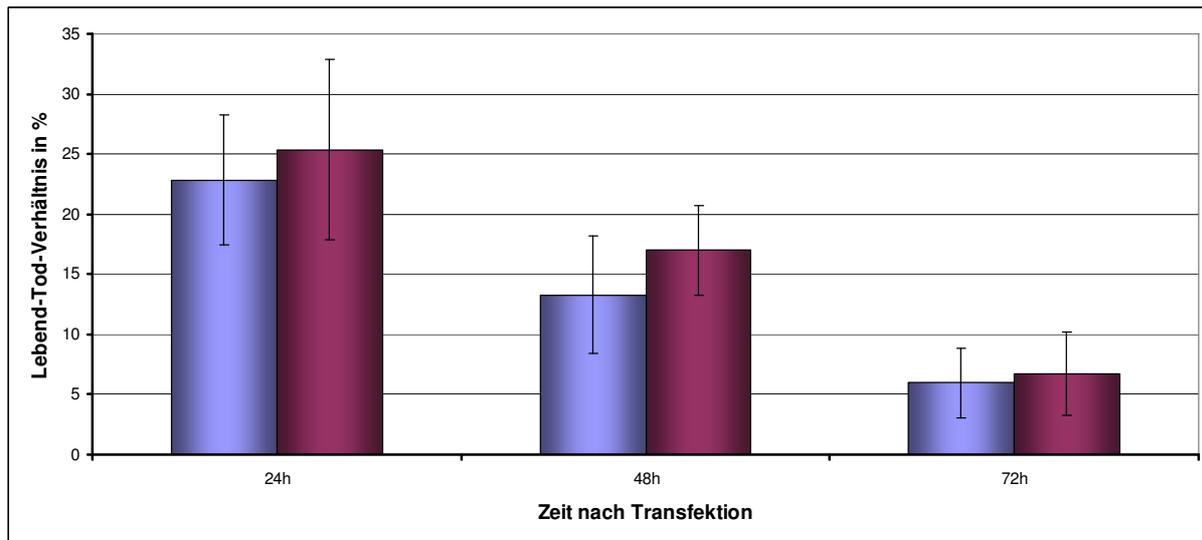


Abb. 33: Prozentualer Anteil toter Zellen in einem Ansatz nach Mock- (blau) bzw. miR-205 Transfektion (rot) zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung. Die Überexpression der miRNA hat keine bzw. nur äußerst geringe Auswirkungen auf das Überleben der Zellen.

Die Überexpression der miR-205 zeigte zu keinem Zeitpunkt eine deutliche Änderung der Zahl toter Zellen in einem Gesamtansatz. So waren nach 24h 22,9% der Mock- und 25,4% der miR-205 transfizierten Zellen tot. 48h nach Transfektion waren immerhin noch 13,3 der Mock- und 17% der miR-205 Zellen tot. Nach 72h hatte der prozentuale Anteil toter Zellen noch weiter abgenommen und lag in beiden Ansätzen bei etwa 6%. Aufgrund der reduzierten Datenmenge für die einzelnen untersuchten Ansätze wurde auf eine Überprüfung der Signifikanz der Ergebnisse mittels gepaarten t-Tests verzichtet.

#### 4.2.13 Einfluss der miRNA-205 auf das mRNA-Expressionslevel

In den ersten durchgeführten Studien über die Wirkungsweise von miRNAs wurde davon ausgegangen, dass nur die Translation der Ziel-mRNAs inhibiert wird, es aber keinen Einfluss auf die mRNA-Menge in der Zelle gibt<sup>24,180</sup>. Neuere Untersuchungen weisen allerdings darauf hin, dass viele miRNAs auch einen rapiden Zerfall der Ziel-mRNAs induzieren können<sup>98,99,101,102,181,182</sup>. Dies würde dann zu einer indirekten Reduktion der Proteinmenge in der Zelle führen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es, außer den Sequenzübereinstimmungen zwischen miRNA und mRNA, keine Anhaltspunkte über die Wahl des Mechanismus der Inhibition. Deshalb ist es schwierig vorherzusagen, welche der beiden Wirkungsweisen auf die Interaktionen zwischen einer miRNA und ihrer möglichen Zielgene zutreffend ist.

Um herauszufinden, in wieweit die miR-205 einen Einfluss auf die mRNA-Menge putativer Zielgene hat, wurden eine Anzahl von möglichen Kandidaten untersucht. Dazu wurden Transfektionsexperimente mit der miR-205 und anschließend quantitative RT-PCRs durchgeführt. Bei den Kandidaten handelte es sich um DGCR8, INPPL1, ARTS, PHB, SMAD1, PKCB, TP53BP2, ERBB3, E2F1 und E2F5. Außer INPPL1 besitzen alle putativen Zielgene mindestens eine Bindestelle für miR-205. Zudem sind fast alle herausgefilterten Proteine in die Regulation des Zellzyklus involviert, einem zentralen Bestandteil der von miR-205-regulierten Gene.

#### 4.2.13.1 Erzeugung von Standardkurven für die zu untersuchenden mutmaßlichen Ziel-mRNAs

Für die quantitative Analyse von putativen Ziel-mRNAs der miR-205 wurden Primerpaare mit dem *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (Roche Diagnostics) generiert und mit dazu passenden Sonden aus der humanen UPL zusammengestellt. In einem ersten Ansatz sollte die Effizienz der einzelnen PCRs bestimmt werden. Dazu wurden Standardreihen aus logarithmisch verdünnter cDNA der unbehandelten HEK-293 Zelllinie erstellt. Für jede der fünf Verdünnungsstufen wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Erstellung der Standardkurven sowie die Berechnungen der PCR-Effizienzen erfolgten durch die LightCycler-Software.

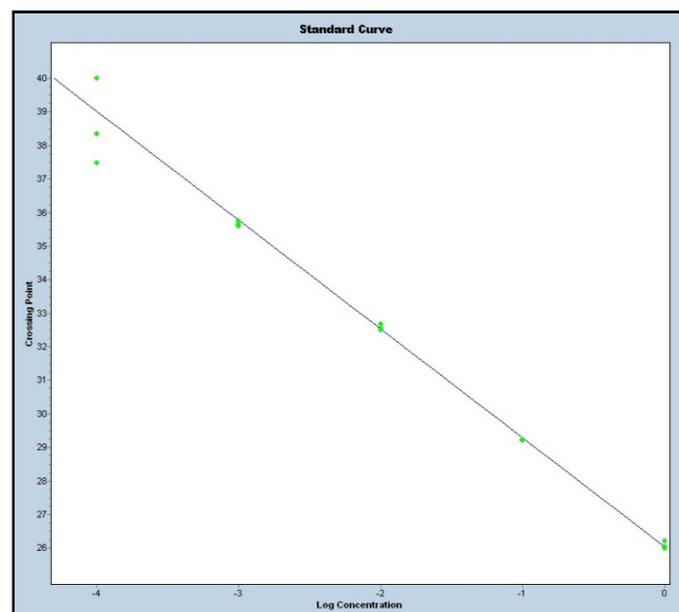


Abb. 34: Beispiel einer von der LightCycler Software erzeugten Standardkurve für E2F1. Auf der X-Achse sind die fünf benutzten Verdünnungsstufen aufgeführt. Auf der Y-Achse sind die Ct-Werte angegeben. Die grünen Punkte kennzeichnen die Ct-Werte der drei parallel durchgeführten Messungen für eine Verdünnungsstufe.

Die durchgeführten quantitativen RT-PCRs waren in allen Fällen erfolgreich und von der LightCycler-Software konnten Standardkurven erstellt werden (siehe Abb. 34). Die Effizienzen der einzelnen PCRs zeigten Schwankungen von 1,934 für PHB bis 2,553 für ERBB3 (siehe Tab. 15). Bei diesen Daten handelt es sich um mathematisch errechnete Werte, da es während eines PCR-Zyklus maximal zu einer Verdopplung der Amplifikate (Effizienz von 2,0) kommen kann. Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Berechnungen für ARTS, DGCR8, E2F1, ERBB3, INPPL1, PKCB, SMAD1 und TP53BP2 eine Effizienz von 2,0 angenommen. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass in HEK-293 Zellen alle Kandidatengene nachweisbar sind und damit exprimiert werden. Dies war eine essentielle Voraussetzung für die anschließenden Versuche.

Tab. 15: Ergebnisse der PCR-Effizienzen nach Berechnungen durch die LightCycler-Software.

Gen	PCR-Effizienz
ARTS	2,028
DGCR8	2,013
E2F1	2,031
E2F5	1,974
ERBB3	2,553
INPPL1	2,021
PKCB	2,013
PHB	1,934
SMAD1	2,015
TP53BP2	2,026

#### 4.2.13.2 Relative Quantifizierungen der putativen Ziel-mRNAs

Um einen Einfluss auf das mRNA-Level möglicher Zielgene qualitativ nachweisen zu können, erfolgten transiente Transfektionen der HEK-293 Zellen mit 5 nM des miR-205 Vorläufermoleküls. In einer Zeitreihe wurden nach 1, 5, 10, 24 und 48 h transfizierten Zellen abgenommen und die mRNA isoliert. Zu Vergleichszwecken wurden parallel dazu Mock-Transfektionen durchgeführt und ebenfalls zu den genannten Zeitpunkten die mRNA extra-

hiert. Alle Transfektionen erfolgten in einem Doppelansatz. Die quantitativen RT-PCRs wurden als technisches Replikat durchgeführt. Die so gewonnenen Werte der miR-205 und Mock-Transfektionen wurden anschließend in ein Verhältnis zueinander gesetzt und Unterschiede in der Expressionsstärke zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion ermittelt (siehe 3.2.3.10.2.1). Dadurch konnten Rückschlüsse auf den Einfluss der miR-205 auf das mRNA-Level der einzelnen untersuchten Zielgene gezogen werden.

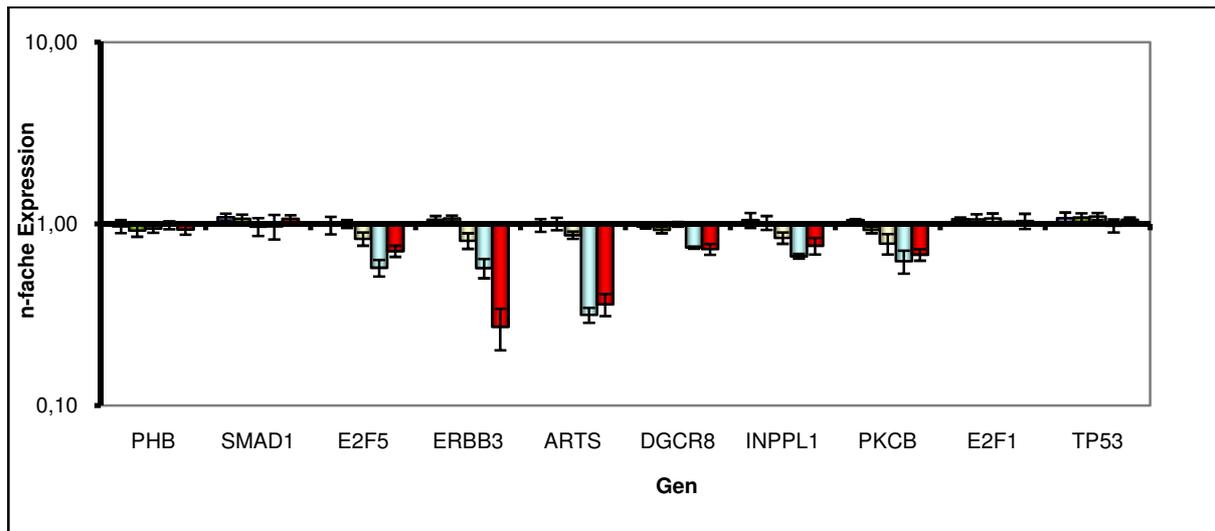


Abb. 35: Ergebnisse der relativen Quantifizierungen von putativen Ziel-mRNAs. Dargestellt ist die n-fache Änderung der Expression nach miR-205 Transfektion im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen. dunkelblau: Messung nach 1 h; grün: Messung nach 5 h; gelb: Messung nach 10 h; hellblau: Messung nach 24 h; rot: Messung nach 48 h.

In den Vergleichen von miR-205 und Mock-transfizierten HEK-293 Zellen ergaben sich für einen Teil der untersuchten putativen Zielgene Änderungen in den Expressionsleveln nach den miRNA-Transfektionen (siehe Abb. 35). So konnten für E2F5, ERBB3, ARTS, DGCR8, INPPL1 und PKCB Unterschiede in den Expressionsstärken nachgewiesen werden. Außer für DGCR8 konnte jeweils 10 h nach der Transfektion eine erste deutliche Änderung der Expression von miR-205 transfizierten Zellen gezeigt werden. Diese lagen zwischen 0,87 für ARTS und 0,78 für PKCB im Vergleich zu den Expressionen der Mock-transfizierten Zellen (=1). Es kam damit zu einer Absenkung des mRNA-Levels in den Zellen um 13 bis 22%. 24 h nach Transfektion verstärkten sich diese Verringerungen der Expressionsstärken weiter und konnten zudem auch in DGCR8 nachgewiesen werden. So ergaben sich zu diesem Zeitpunkt Reduktionen zwischen 0,74 für DGCR8 und 0,32 für ARTS im Vergleich zu den jeweiligen Expressionen der Mock-transfizierten Zellen (=1). Dies entsprach Verringerungen um 26 bis

68%. 48 h nach der Transfektion stagnierten diese Werte in einigen Fällen (ARTS, DGCR8, PKCB), in anderen erhöhten sich die Expressionslevel der putativen Zielgene auch wieder (E2F5, INPPL1). Nur das mRNA-Level von ERBB3 verringerte sich weiter. Die Werte lagen zu diesem Zeitpunkt zwischen 0,73 für DGCR8 und 0,27 für ERBB3 im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen (=1). Dies entsprach Absenkungen von 27 bis 73%. Die Analysen von PHB, SMAD1, E2F1 und TP53 ergaben zu keinem Messzeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expressionslevel nach einer miR-205 Transfektion. Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse ist im Anhang aufgeführt.

#### 4.2.14 Einfluss der miRNA-205 auf das Proteinlevel

Nachdem für einige putative Zielgene eine Änderung der mRNA-Expressionsstärke nach Transfektion mit der miR-205 *in vitro* nachgewiesen werden konnte (siehe 4.2.13), sollte in einem weiteren Schritt ein möglicher Einfluss auf die Proteinmenge bestimmt werden. Da miRNAs primär auf der posttranslationalen Ebene agieren, besteht die Möglichkeit auch für die mutmaßlichen Zielgene eine Regulation durch miR-205 nachweisen zu können, für die dies auf mRNA-Ebene nicht gelungen ist. Zudem kann es auf Proteinebene auch zu stärkeren Effekten durch die miR-205 kommen, als sie mittels quantitativen RT-PCRs für die untersuchten mRNAs nachweisbar waren.

Die nachfolgenden Untersuchungen erfolgten an den mutmaßlichen Zielgenen ARTS, PHB, INPPL1 und PKCB. Für ARTS konnte nach Transfektion mit der Pre-miR-205 eine deutliche Reduktion der mRNA-Menge von bis zu 68% nachgewiesen werden. Eine Herabregulation auch auf Proteinebene ist dadurch annehmbar. Zudem hat ARTS den höchsten Wert (12,60) in den Vorhersagen der PicTar-Datenbank und vier mutmaßliche Bindestellen für miR-205. Für INPPL1 und PKCB konnte in den zuvor durchgeführten Analysen nur eine geringe Änderung des mRNA-Levels detektiert werden. Die Reduktionen lagen maximal bei 34 bzw. 38% im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen. Beide putative Zielgene besitzen laut bioinformatischen Untersuchungen allerdings sehr vielversprechende Strukturen in ihren 3'UTRs. So ist für INPPL1 genau eine Bindestelle für miR-205 und eine für miR-184 vorhergesagt, für PKCB ebenfalls eine für miR-184 und zwei weitere für miR-203. Zuletzt wurde auch der Einfluss auf die Protein-Expression von PHB analysiert. Das mRNA-Level zeigte keine Änderungen nach Transfektion mit miR-205. So ist es interessant zu sehen, ob es bei diesem Gen zu einer rein posttranslationalen Regulation kommt. PicTar gibt für dieses Gen ebenfalls ei-

nen relativ hohen Wert von 8,94 an und es werden immerhin zwei mutmaßliche Bindestellen für miR-205 vorhergesagt.

#### 4.2.14.1 Etablierung von Nachweismethoden zur Detektion der mutmaßlichen Ziel-Proteine

Eine klassische Methode zum Nachweis von Proteinen stellt der Western Blot dar. Um optimale Detektionsbedingungen für jedes Protein zu schaffen, wurden vor den eigentlichen Versuchen mehrere Zelllinien auf ihre Eignung hin untersucht. Dazu erfolgte für jeden zum Nachweis benutzten Antikörper der Test auf eine Expression des entsprechenden Proteins in den drei Karzinom-Zelllinien KU-19-19, T24 und TCC-SUP. Da nicht jedes Protein in jeder Zelllinie gleich stark vorhanden ist, wurden zudem jeweils 20 und 40 µg Gesamt-Proteinmenge eingesetzt.

##### 4.2.14.1.1 Etablierung des ARTS-Antikörpers

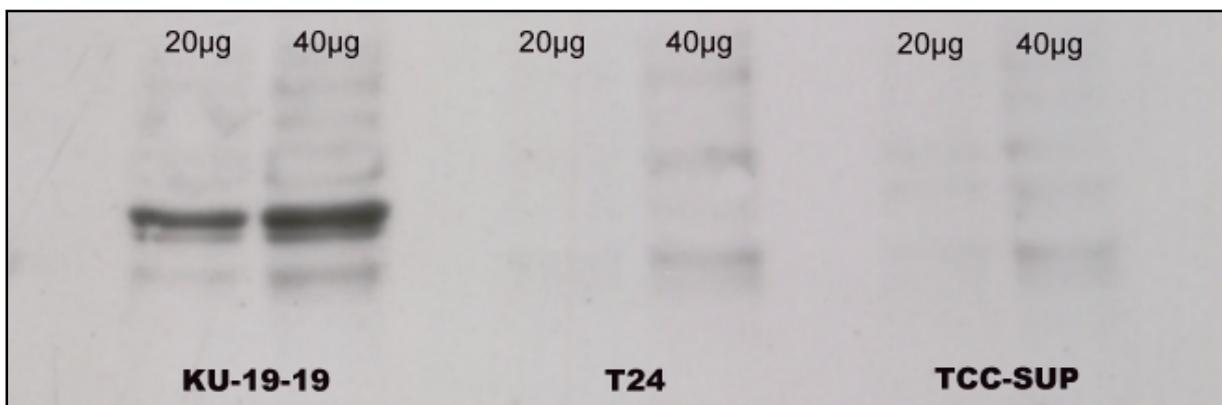


Abb. 36: Nachweis des ARTS-Proteins (32 kDa) in den Zelllinien KU-19-19, TCC-SUP und T24. Es wurden jeweils 20 und 40 µg Gesamt-Protein eingesetzt. A-ARTS (Primärantikörper) wurde 1:1000 verdünnt benutzt,  $\alpha$ -mouse (Sekundärantikörper) 1:10000. Die Filmexposition erfolgte für 20 min.

Die stärkste Expression des ARTS-Proteins konnte in KU-19-19 Zellen nachgewiesen werden. Sowohl bei 20 als auch bei 40 µg eingesetzten Gesamt-Proteins erfolgte eine deutliche Visualisierung der entsprechenden Bande auf dem exponierten Film. Neben der spezifischen ARTS-Bande sind einige unspezifische Banden erkennbar. Diese haben aber keinen störenden Einfluss auf die Auswertbarkeit des Western Blots. Für die nachfolgenden Transfektions-Experimente wurden stets 40 µg Gesamt-Proteinmenge eingesetzt.

#### 4.2.14.1.2 Etablierung des INPPL1-Antikörpers

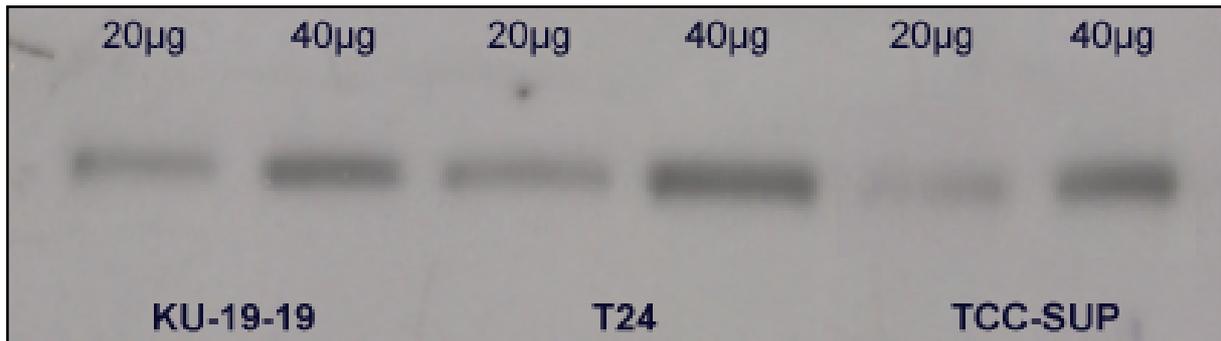


Abb. 37: Nachweis des INPPL1-Proteins (139 kDa) in den Zelllinien KU-19-19, TCC-SUP und T24. Es wurden jeweils 20 und 40 µg Gesamt-Protein eingesetzt. A-INPPL1 (Primärantikörper) wurde 1:500 verdünnt benutzt,  $\alpha$ -mouse (Sekundärantikörper) 1:10000. Die Filmexposition erfolgte für 30 min.

Die Expression des INPPL1-Proteins war in allen untersuchten Zelllinien etwa gleich stark. Eine bessere Visualisierung ist in den analysierten Zellen jeweils bei 40 µg eingesetzten Gesamt-Proteins erreicht worden. Aus Gründen der leichteren Handhabung wurden die nachfolgenden Transfektionsexperimente mit T24 Zellen durchgeführt und anschließend 40 µg Gesamt-Proteinmenge eingesetzt.

#### 4.2.14.1.3 Etablierung des PHB-Antikörpers

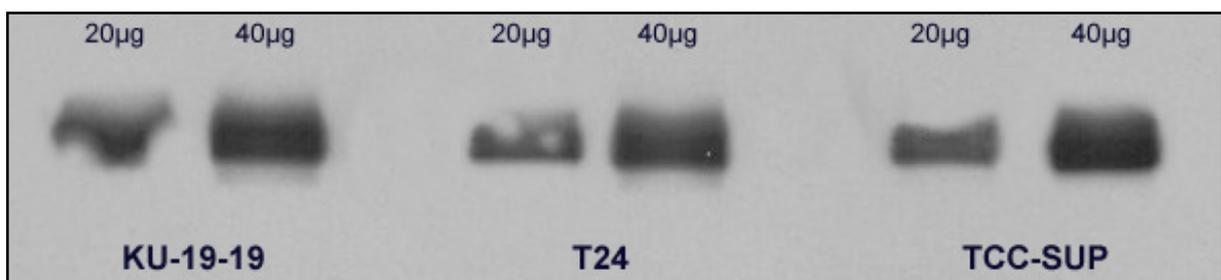


Abb. 38: Nachweis des PHB-Proteins (30 kDa) in den Zelllinien KU-19-19, TCC-SUP und T24. Es wurden jeweils 20 und 40 µg Gesamt-Protein eingesetzt. A-PHB (Primärantikörper) wurde 1:250 verdünnt benutzt,  $\alpha$ -mouse (Sekundärantikörper) 1:10000. Die Filmexposition erfolgte für 5 min.

Die PHB-Proteinexpression konnte ebenfalls in den drei analysierten Zelllinien in etwa gleicher Ausprägung nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden auch hier in den nachfolgenden Experimenten T24 Zellen und eine Gesamt-Proteinkonzentration von 40 µg benutzt.

#### 4.2.14.1.4 Etablierung des PKCB-Antikörpers

Für den Nachweis des PKCB-Proteins in Zellen wurde anschließend ebenfalls versucht, einen Western Blot mit optimierten Bedingungen zu erzeugen. Die entsprechenden Bemühungen brachten aber keine befriedigenden Ergebnisse. So waren neben der einen erwarteten PKCB-Bande stets mehrere Nebenbanden zu erkennen, bei denen es sich vermutlich um verschiedene Splicevarianten des PKCB-Proteins handelte (Abbildung nicht gezeigt). Um es trotzdem zu ermöglichen, zumindest eine grobe Abschätzung über eine eventuelle miR-205 Wirkung vornehmen zu können, wurde versucht, in den Zellen PKCB auf immunhistochemischer Basis nachzuweisen. Dazu wurden HEK-293 Zellen in das Unterhautfettgewebe einer toten Maus gespritzt. Anschließend wurde dieser Bereich Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet, 5 µm dicke Schnitte auf einen Objektträger aufgebracht und diese anschließend mit  $\alpha$ -PKCB (Primärantikörper) und einem  $\alpha$ -Kaninchen-Antikörper (Sekundärantikörper) behandelt. Die Lokalisation des HRP-konjugierten Sekundärantikörpers, und damit auch des PKCB-Proteins, konnte anschließend in einer enzymatischen Reaktion unter Zugabe von DAB und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sichtbar gemacht werden.

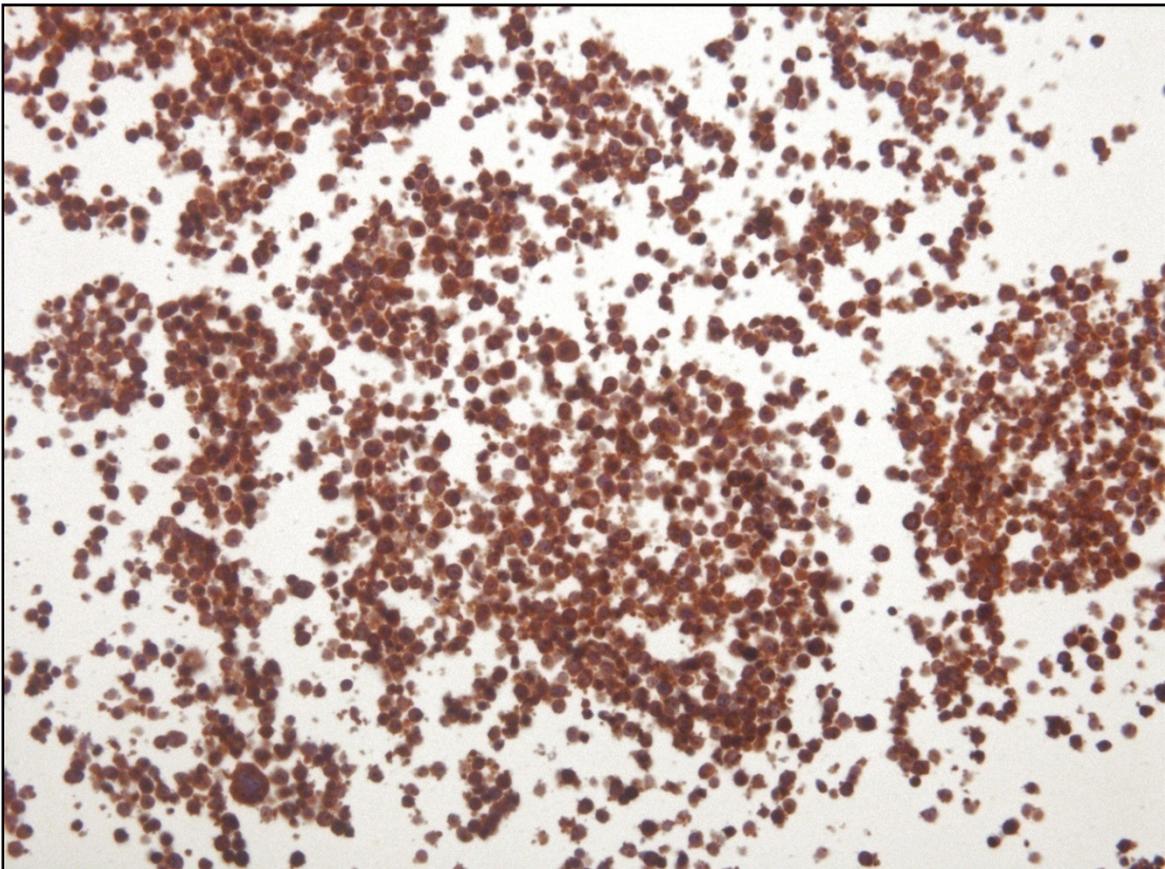


Abb. 39: Nachweis des PKCB-Proteins in unbehandelten HEK-293 Zellen nach Formalin-Fixierung und anschließender Einbettung in Paraffin. Die Abbildung wurde mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

Durch das beschriebene System war es möglich, dass PKCB-Protein in den HEK-293 Zellen nachzuweisen. Eine Quantifizierung ist dadurch zwar relativ schlecht möglich, einen groben Anhaltspunkt über eine Regulation durch miR-205 dürfte in den nachfolgenden Transfektionsexperimenten aber möglich sein.

#### 4.2.14.2 Nachweis einer regulatorischen Wirkung von miRNA-205 auf die Proteinmenge mutmaßlicher Zielgene

Zum Nachweis eventueller Wirkungen von miR-205 auf die Proteinmengen von ARTS, PHB, INPPL1 oder PKCB wurden transiente Transfektionen mit dem entsprechenden Vorläufermolekül (5 nM) durchgeführt. Nach 24, 48 und 72 h erfolgte die Abnahme und Lyse der jeweiligen Zellen. Parallel dazu wurden zu jedem Zeitpunkt auch die Proteine aus Mock-transfizierte Zellen extrahiert. Für die anschließenden Western Blot Analysen wurden jeweils 40 µg Gesamt-Proteinmenge und optimierte Antikörper-Konzentrationen eingesetzt (siehe 4.2.14.1). Um eine Abschätzung über die Proteinmenge nach dem Blotten auf die Membran zu erhalten, wurde nach der Detektion des mutmaßlichen Zielproteins diese „gestriped“ und in einer zweiten Reaktion die Menge des  $\alpha$ -Tubulin Proteins bestimmt. Bei diesem Protein handelt es sich um einen essentiellen Bestandteil der Zelle, der ubiquitär sehr stark exprimiert wird und sich deshalb als Ladekontrolle gut eignet.

##### 4.2.14.2.1 Nachweis eines Effekts auf INPPL1

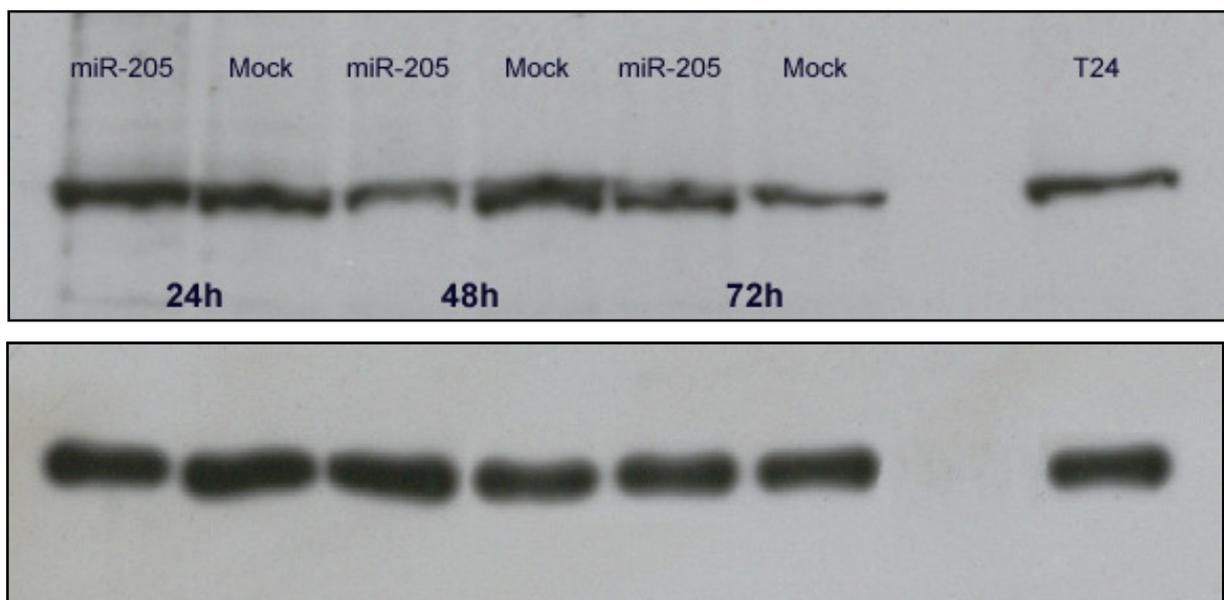


Abb. 40: Nachweis des INPPL1-Proteins (139 kDA) in miR-205 und Mock-transfizierten T24 Zellen (oben). A-INPPL1 (Primärantikörper) wurde 1:500 verdünnt benutzt,  $\alpha$ -mouse (Sekundärantikörper) 1:10000. Die Filmexposition erfolgte für 25 min. Als Ladekontrolle erfolgte anschließend der Nachweis des  $\alpha$ -Tubulin-Proteins (55 kDA). A- $\alpha$ -Tubulin (Primärantikörper) wurde 1:1000 verdünnt eingesetzt,  $\alpha$ -mouse (Sekundärantikörper) 1:10000. Die Filmexposition erfolgte für 15 min.

Die Transfektion der T24 Zellen mit der Pre-miR-205 zeigte nur geringe Auswirkungen auf die Proteinmenge von INPPL1. Nach 24 h konnten keine Unterschiede zwischen miR-205 und Mock-transfizierten Zellen nachgewiesen werden. 48 h nach Transfektion zeigte sich eine geringe Abnahme des INPPL1-Proteins in den miRNA-transfizierten Zellen im direkten Vergleich zur entsprechenden Mock-Behandlung. Nach 72 h war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Vielmehr schien es zu einer Verringerung der INPPL1-Menge in den Mock-transfizierten Zellen im Vergleich zur miR-205 Transfektion gekommen zu sein. Da die Menge an  $\alpha$ -Tubulin in allen Ansätzen annähernd gleich war, konnte man von einer gleichmäßigen Proteinmenge in allen aufgetragenen Ansätzen ausgehen. Die Bandenstärken des INPPL1-Proteins waren also direkt miteinander vergleichbar.

#### 4.2.14.2.2 Nachweis eines Effekts auf ARTS

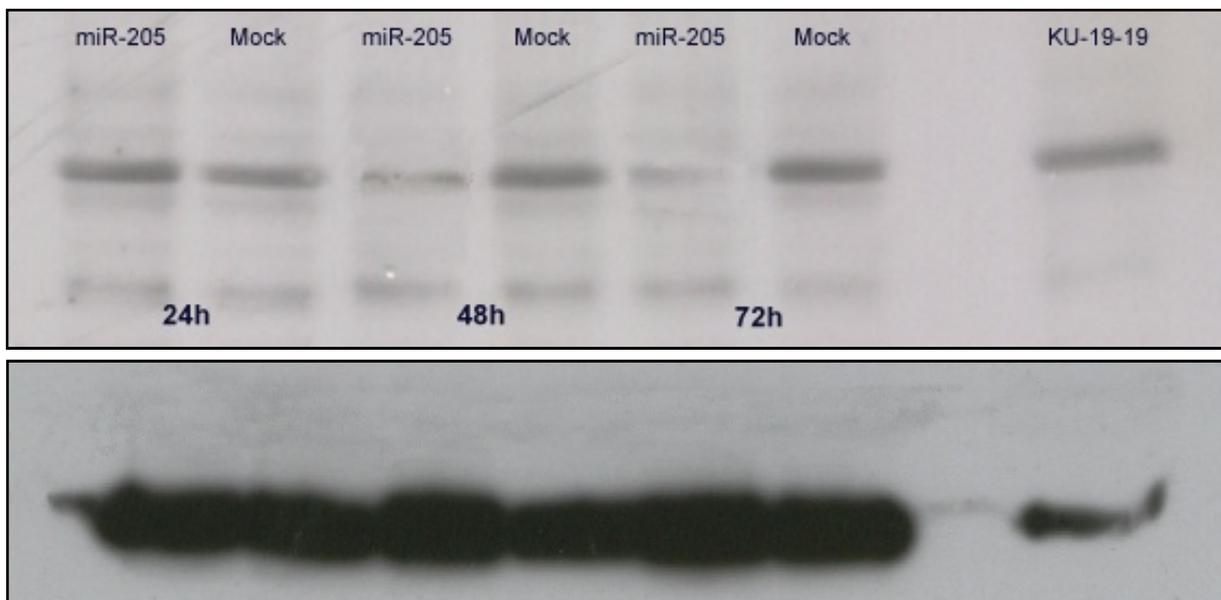


Abb. 41: Nachweis des ARTS-Proteins (32 kDA) in miR-205 und Mock-transfizierten KU-19-19 Zellen (oben). A-ARTS (Primärantikörper) wurde 1:1000 verdünnt benutzt,  $\alpha$ -mouse (Sekundärantikörper) 1:10000. Die Filmexposition erfolgte für 20 min. Als Ladekontrolle erfolgte anschließend der Nachweis des  $\alpha$ -Tubulin-Proteins (55 kDA). A- $\alpha$ -Tubulin (Primärantikörper) wurde 1:1000 verdünnt eingesetzt,  $\alpha$ -mouse (Sekundärantikörper) 1:10000 Die Filmexposition erfolgte für 20 min.

Die Transfektion mit dem miR-205 Vorläufermolekül hatte Auswirkungen auf die Proteinmenge von ARTS. So zeigte sich 24 h nach Transfektion noch kein Unterschied zwischen miRNA- und Mock-transfizierten Zellen, allerdings sowohl nach 48 als auch nach 72 h. In beiden Fällen waren die ARTS-Banden deutlich geringer ausgeprägt im Vergleich zu den Mock-Transfektionen. Auch nahm die Menge an nachgewiesenem ARTS-Protein zwischen der 48 und 72 h Messung sogar noch ab. Die Kontrolle der Proteinladung mittels  $\alpha$ -Tubulin zeigte eine gleichmäßige Beladung der Membran, die ARTS-Banden waren also direkt miteinander vergleichbar.

#### 4.2.14.2.3 Nachweis eines Effekts auf PHB

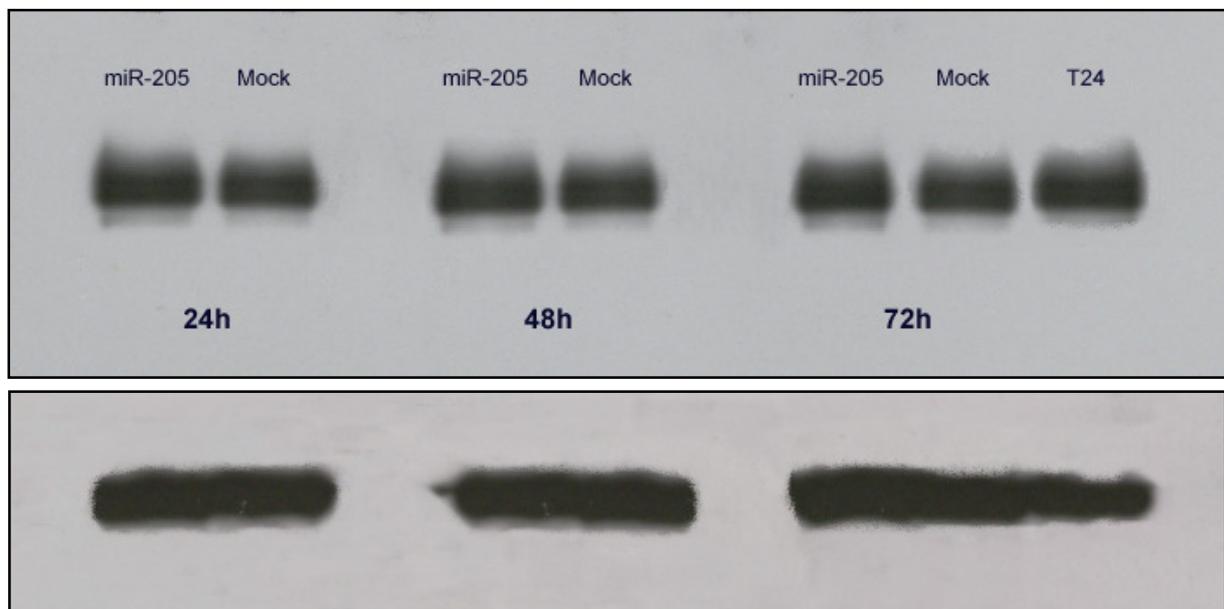


Abb. 42: Nachweis des PHB-Proteins (30 kDA) in miR-205 und Mock-transfizierten T24 Zellen (oben). A-ARTS (Primärantikörper) wurde 1:1000 verdünnt benutzt,  $\alpha$ -mouse (Sekundärantikörper) 1:250. Die Filmexposition erfolgte für 5 min. Als Ladekontrolle erfolgte anschließend der Nachweis des  $\alpha$ -Tubulin-Proteins (55 kDA). A- $\alpha$ -Tubulin (Primärantikörper) wurde 1:1000 verdünnt eingesetzt,  $\alpha$ -mouse (Sekundärantikörper) 1:10000 Die Filmexposition erfolgte für 20 min.

Die Transfektion der T24 Zellen mit der Pre-miR-205 zeigte zu keinem der drei untersuchten Zeitpunkte einen Effekt auf die Menge an PHB-Protein. Da die nachgewiesenen Mengen an  $\alpha$ -Tubulin in allen Proben relativ gleich waren, konnten die PHB-Banden direkt miteinander verglichen werden.

#### 4.2.14.2.4 Nachweis eines Effekts auf PKCB

Da der Nachweis des PKCB-Proteins nicht mittels Western Blot Analyse erfolgen konnte, wurden nach 48 h die miR-205 und Mock-transfizierten Zellen in das Unterhautfettgewebe einer toten Maus injiziert und wie zuvor beschrieben weiter verarbeitet (siehe 4.2.14.1.4).

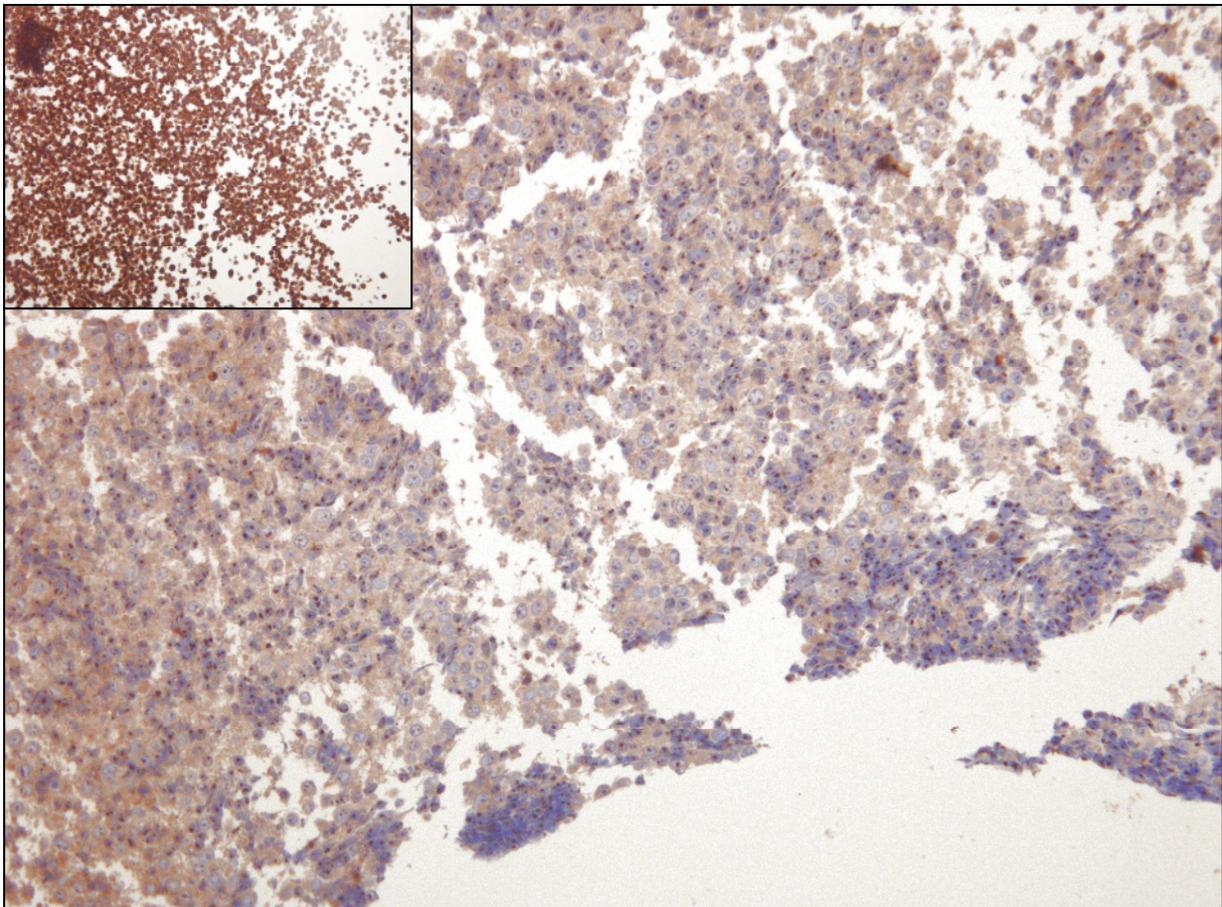


Abb. 43: Nachweis des PKCB-Proteins in miR-205 (großes Bild) und Mock-transfizierten (kleines Bild) HEK-293 Zellen. Die Zellen wurden in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Abbildungen wurden mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die Intensität der PKCB-Färbungen nach miR-205 Transfektion waren im Allgemeinen geringer als in den parallel dazu Mock-transfizierten HEK-293 Zellen. Diese immunohistochemi-

schen Reaktionen lassen allerdings, im Gegensatz zu Western Blot Analysen, nur eine begrenzte Aussage über die konkrete Reduktion der Proteinmenge zu, da die Färbungen nicht unbedingt gleichmäßig erfolgten und auch Zellansammlungen mit einer relativ starken PKCB-Proteinexpression nachzuweisen waren.

#### 4.2.15 Nachweis der direkten Regulation von Zielgenen durch die miRNA-205

Nachdem für mehrere putative Zielgene sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene Änderungen in den Expressionsstärken nach Transfektionen mit dem miR-205 Vorläufermolekül nachweisbar waren, sollten abschließend direkte Interaktionen zwischen der miRNA und diesen Genen nachgewiesen werden. Für diese Untersuchungen wurden ARTS und INPPL1 herangezogen, die nach Transfektionen jeweils mehr oder weniger ausgeprägte Effekte zeigten (siehe 4.2.13.2, 4.2.14.2.1 und 4.2.14.2.2). Für beide Gene konnten in bioinformatischen Analysen zudem mögliche Bindestellen für miR-205 vorhergesagt werden. Für ARTS waren das vier und für INPPL1 eine Sequenz (siehe 4.2.10). Dadurch war die Wahrscheinlichkeit relativ groß, eine direkte miRNA/mRNA-Interaktion nachweisen zu können. Die Sequenzen der beiden 3'UTRs sind im Anhang aufgeführt.

Eine verbreitete Methode zur Analyse von direkten Regulationen der Zielgene durch die entsprechenden miRNAs stellt das Luciferase-Assay dar. Ursprünglich für Promotorstudien entwickelt, hat es in den letzten Jahren auch bei Interaktionsstudien weite Verbreitung gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System* (Promega) genutzt, welches auf einer Messung der Umsetzung des eingesetzten Substrats durch die Luciferase basiert. Die entstehende Chemilumineszenz kann dabei quantitativ erfasst und Rückschlüsse auf die Aktivität der Luciferase gezogen werden. In einem ersten Schritt wird dazu die 3'UTR des mutmaßlichen Zielgens in die 3'UTR des Luciferasegens (aus *Photinus pyralis*; Firefly) integriert. Anschließend erfolgen das Einbringen dieses Testvektors zusammen mit der miRNA (als Pre- bzw. Anti-miRNA) in Zellen und der Vergleich der Intensität der Luciferaseexpression mit einem Kontrollansatz. Als dieser dient die parallel dazu durchgeführte Transfektion mit dem modifizierten Testvektor und ohne miRNA. Um Experimente miteinander vergleichen zu können und ein Maß für die Transfektionseffizienz zu erhalten, wird zusätzlich ein weiterer, unmodifizierter Reportervektor mit einer Luciferase aus *Renilla reformis* in die Zellen eingebracht. Dieser bewirkt ebenfalls eine Chemilumineszenz, benötigt

dafür aber ein anderes Substrat und einen anderen pH-Wert. Eine Unterscheidung der Expressionsstärken der beiden Vektoren ist im Rahmen der Messungen damit also möglich.

#### 4.2.15.1 Erzeugung von Testvektoren

Für die Herstellung der Testvektoren von ARTS und INPPL1 wurden in einem ersten Schritt die 3'UTRs aus cDNA amplifiziert. Diese hatte im Fall von ARTS eine Länge von 1504 bp bei der längsten Transkriptvariante 4 und von 751 bp bei INPPL1. Mit den PCRs wurden an beiden Enden der Amplifikate künstliche *Xba*I-Schnittstellen generiert. Diese dienten dem anschließenden Einbringen in den pGL3-Control Vektor, der im Weiteren als Testvektor funktionierte. Die Verifizierung der erzeugten Klone und der Nachweis der korrekten Orientierungen der PCR-Produkte erfolgten in einem ersten Schritt durch eine Reihe von Restriktionsverdauungen und bei positiven Ergebnissen durch Sequenzierungen.

#### 4.2.15.2 Messungen der Luciferaseexpressionen

Da die Effizienz dieser Testmethode von vielen Faktoren (z.B. verwendete Zelllinie, Inkubationsdauer, Menge des Testvektors, des Kontrollvektors und der miRNA) abhängig ist, wurden für die Optimierung des Systems bereits publizierte Studien verwendet<sup>183,184</sup>. Für den Nachweis einer mRNA/miRNA-Interaktion wurden 50 ng der modifizierten *Firefly*-Testvektoren zusammen mit 5 ng des *Renilla*-Normalisierungsvektors und 5 nM der Pre-miR-205 in HEK-293 Zellen cotransfiziert. Nach 48 h erfolgten die Lyse der Zellen und anschließend die Messungen der beiden Luciferase-Aktivitäten. Ein inhibitorischer Effekt wurde durch den Quotienten der normalisierten *Firefly*-Luciferaseaktivität nach einer Transfektion mit miR-205 und der entsprechenden Aktivität bei einem Kontroll-Experiment ermittelt. Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe der *Renilla*-Luciferaseaktivität. Für jedes der beiden Gene wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils drei Ansätzen durchgeführt.

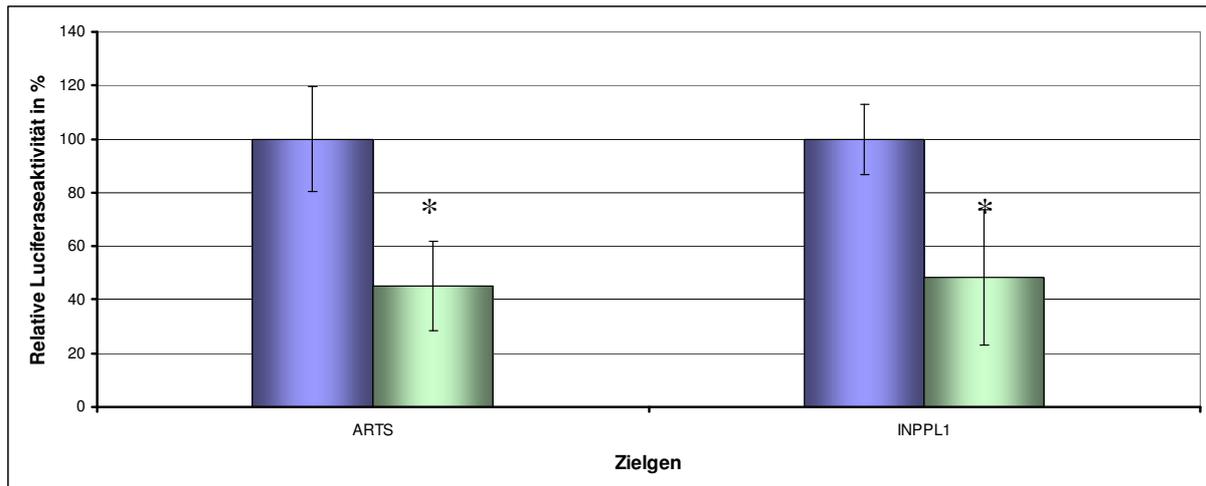


Abb. 44: Ergebnisse der Luciferase-Assays von ARTS und INPPL1 in HEK-293 Zellen zum Nachweis von Interaktionen mit miR-205. In beiden Fällen ist 48 h nach Transfektion mit dem miR-205 Vorläufermolekül eine deutliche Reduktion der Luciferaseaktivität nachweisbar. blau: Kontrollansatz; grün: Pre-miR-205; Stern: signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) im t-Test.

Die Messungen der Luciferaseaktivitäten in HEK-293-Zellen ergaben für die beiden untersuchten Gene deutliche Reduktionen nach Transfektion von miR-205. Für ARTS verringerte sich die Aktivität um 55%, für INPPL1 um 51,8%. Die Tests auf Signifikanz der gewonnenen Daten mittels gepaarter t-Tests mit zweiseitigen Verteilungen erbrachte für beide Ansätze einen positiven Wert (p-Werte: 0,000002 und 0,000006). Eine tabellarische Auflistung der Ergebnisse ist im Anhang aufgeführt.

Um herauszufinden, ob eine Regulation der beiden mutmaßlichen Zielgene auch durch die endogen vorhandene miR-205 möglich ist, wurden die beschriebenen Versuche ebenfalls mit KU-19-19 Zellen durchgeführt. Da diese Zellen ein sehr starkes eigenes miR-205 Expressionslevel besitzen, war zudem ein Ansatz möglich, in dem versucht wurde die Luciferaseaktivität durch Inhibition der endogenen miR-205 zu beeinflussen. Die Ansätze für das miR-205 Vorläufermolekül und die Kontrolle erfolgten wie zuvor beschrieben. Bei dem Anti-miR-205 Ansatz wurden 50 nM der Anti-miR-205 zusammen mit dem Test- und dem Normalisierungsvektor in die Zellen eingebracht und die Luciferaseaktivität nach 48 h gemessen.

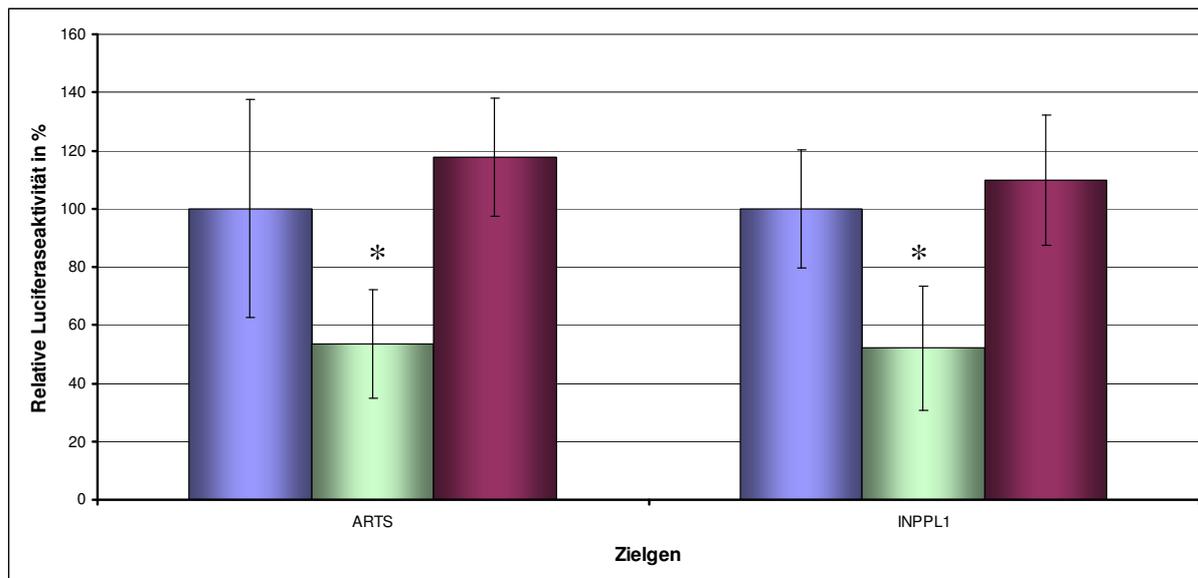


Abb. 45: Ergebnisse der Luciferase-Assays von ARTS und INPPL1 in KU-19-19 Zellen zum Nachweis von Interaktionen mit miR-205. In beiden Fällen ist 48 h nach Transfektion mit dem miR-205 Vorläufermolekül eine deutliche Reduktion der Luciferaseaktivität nachweisbar. Die Transfektion mit der Anti-miR-205 führte bei beiden Zielgenen zu einer leichten Erhöhung der Luciferaseaktivität. blau: Kontrollansatz; grün: Pre-miR-205; rot: Anti-miR-205; Stern: signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) im t-Test.

Die Luciferaseaktivitäten konnten auch in KU-19-19 Zellen durch das Einbringen des miR-205 Vorläufermoleküls deutlich reduziert werden. Für ARTS verringerte sich die Aktivität um 46,3%, für INPPL1 um 57,9%. Die Tests auf Signifikanz der ermittelten Daten mittels gepaarter t-Tests mit zweiseitigen Verteilungen erbrachten für beide Ansätze einen positiven Wert (p-Werte: 0,0019 und 0,00001). Anzumerken ist, dass die Stärke der Luciferaseexpressionen sowohl in den miR-205 als auch in den Mock-Ansätzen deutlich geringer war als bei den vergleichbaren Transfektionen in HEK-293. Dieser, auf die endogen vorhandene miR-205 zurückzuführende, Effekt konnte durch das Einbringen der Anti-miR-205 leicht reduziert werden. So stiegen die Expressionsstärken nach den Transfektionen um 17,9% für ARTS bzw. um 9,9% für INPPL1. Die Tests auf Signifikanz der Werte mittels gepaarter t-Tests mit zweiseitigen Verteilungen waren für beide Ansätze negativ (p-Werte: 0,3 und 0,4), eine Tendenz war aber vorhanden. Eine tabellarische Auflistung der Ergebnisse ist im Anhang aufgeführt.

## 5 Diskussion

### 5.1 MiRNA-Expressionsprofile von DLBCL und FL

#### 5.1.1 MiRNA-Expressionsprofile unterscheiden zwischen DLBCL, FL und Normalgewebe

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass schon eine geringe Zahl an miRNAs eine eindeutigere Zuordnung zu bestimmten Tumorentitäten ermöglicht als dies durch mRNA-Expressionsprofile möglich ist <sup>121</sup>. Durch die, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCRs von 157 miRNAs, konnten von DLBCLs und FLs Expressionsprofile erstellt werden. Dabei wurden miRNAs gefunden, die zwischen beiden Lymphomentitäten sowie Normalgewebe unterscheiden können. Zudem sind einige miRNAs sowohl bei DLBCLs als auch FLs differentiell exprimiert.

Der Vergleich der miRNA-Signaturen von DLBCLs und FLs mit reaktiven Lymphknoten erbrachte 15 differentiell exprimierte miRNAs für DLBCLs und zwölf für FLs. Dabei war die Expression der meisten dysregulierten miRNAs in den DLBCL-Fällen herab reguliert (11 von 15), während das Gegenteil in den FL-Proben der Fall war (9 von 12) (siehe 4.1.1 und 4.1.2). Dies ist eher ungewöhnlich, da zuvor eher von einer geringeren miRNA Expression in malignem, im Vergleich zu nicht-malignem, Gewebe berichtet wurde <sup>121</sup>. Neben dem großen Unterschied zwischen DLBCLs und FLs gab es auch Gemeinsamkeiten zwischen beiden. So waren miR-210, miR-155 und miR-106a beim Vergleich mit „normalem“ Gewebe in beiden Lymphomentitäten herauf reguliert. Dagegen war die Expression von miR-149 und miR-139 sowohl in DLBCLs als auch FLs reduziert. Möglicherweise sind diese fünf miRNAs deshalb generell in die Entwicklung von Lymphomen involviert. Dazu passt, dass miR-155 eine kritische Rolle in der B-Zell-Reifung und Lymphozytenaktivierung spielt <sup>200,201</sup>. Studien an transgenen Mäusen ergaben zudem, dass die Überexpression von miR-155 zu einer Entwicklung von B-Zell-Malignitäten führt <sup>202</sup>. Weiterhin wiesen eine Vielzahl von Untersuchungen verschiedenster Krebserkrankungen, unter ihnen auch Lymphome, eine erhöhte Expression von miR-155 nach <sup>125,138,202-206</sup>. Vor kurzem wurde zudem eine Korrelation zwischen der miR-155 und der NF- $\kappa$ B Expression in DLBCL-Zelllinien gefunden <sup>207</sup>. Eine weitere der generell dysregulierten miRNAs, die miR-210, scheint ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entstehung von Tumoren zu spielen. So wurde sie als eine der Schlüsselregulatoren des Zellzyklus identifiziert <sup>208</sup>. Über die Funktionen der restlichen drei miRNAs ist dagegen wenig bekannt. Dies

macht Spekulationen über ihre Rolle während der Entwicklung von Lymphomen zum jetzigen Zeitpunkt sehr schwierig.

Beim Vergleich der Expressionsprofile beider Lymphomentitäten miteinander wurden zehn dysregulierte miRNAs gefunden. Dabei waren DLBCLs erneut überwiegend durch die Herabregulation der miRNAs charakterisiert (8 von 10). FLs wurden hauptsächlich durch die Expression von miR-9/9\*, miR-301, miR-213, miR-330 und miR-338 definiert, während sich DLBCLs durch die Expression von miR-150, miR-17-5p, miR-145, miR-328, miR-99a, miR-10a, miR-95, miR-151 und let-7e charakterisierten. Einige dieser miRNAs konnten bereits mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht werden. So wurde die, in DLBCLs am stärksten herab regulierte, miR-150 bereits mit der Kontrolle der B-Zell Entwicklung in Verbindung gebracht und als signifikant herauf reguliert in chronisch lymphatischen Leukämien (CLL) identifiziert<sup>209-211</sup>. Diese miRNA könnte also eine sehr wichtige Rolle in der Entwicklung verschiedener lymphatischer Neoplasien spielen. Eine signifikante Dysregulation von miR-10a in akuten myeloischen Leukämien (AML) und sowohl von miR-17-5p als auch von miR-145 in verschiedenen anderen Krebsarten wurde ebenfalls beschrieben<sup>123,194,205,212-215</sup>. Auch die Regulation des Transkriptionsfaktors E2F1 – einem bekannten Ziel des Protoonkogens MYC – durch miR-17-5p wurde von O'Donnell *et al.* nachgewiesen<sup>216</sup>. Es scheint sich bei diesen drei miRNAs also eventuell um allgemeine Regulatoren während der Entstehung von Tumoren zu handeln.

### 5.1.2 MiRNA-Expressionsprofile können nicht für die Unterscheidung von GCB- und non-GCB-DLBCL genutzt werden

In retrospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass GCB-DLBCL-Patienten ein besseres Gesamtüberleben im Vergleich zu ABC-DLBCL-Patienten haben<sup>165</sup>. Eine Subtypisierung der DLBCLs mittels miRNA-Expressionsprofilen wäre somit eine gute Möglichkeit, Aussagen über die Krankheitsentwicklung zu geben. Lawrie *et al.* waren in ihrer Studie in der Lage DLBCLs in GCB- und non-GCB-Fälle durch die Expressionslevel von miR-155, miR-21 und miR-221 zu diskriminieren<sup>206</sup>. Passend dazu wurde die miR-155 schon zuvor als überexprimiert in ABC-DLBCLs beschrieben<sup>138</sup>. Auch Garzon *et al.* war es in ihren Untersuchungen möglich miRNA-Signaturen mit definierten cytogenetischen Subgruppen von AML-Patienten in Verbindung zu bringen<sup>217</sup>. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit dieselben statistischen Analysemethoden wie von Lawrie *et al.* genutzt wurden, konnten die entsprechenden Resultate

nicht bestätigt werden. Bei der Anzahl an GCB- und non-GCB-Fällen (jeweils 25) ist es allerdings eher ungewöhnlich, dass keine Kombination von miRNA-Profilen für die Subtypisierung selektiert werden konnte (siehe 4.1.5). Eine mögliche Erklärung wäre die schlechte Reproduzierbarkeit des immunhistochemischen Klassifikators nach Hans *et al.*<sup>248</sup>. Weiterhin ist es auch möglich, dass es zwar Unterschiede zwischen GCB- und non-GCB auf mRNA- bzw. Proteinebene gibt, die miRNA-Signaturen beider Untergruppen dagegen gleich oder sehr ähnlich sind. Dann würden die mRNA-Expressionsunterschiede eine andere Ursache als die Mixexpression von miRNAs haben. Die Liste von möglichen Kandidaten enthält immerhin die, auch von Lawrie *et al.* gefundene, miR-155. Diese, wie auch alle anderen differentiell exprimierten miRNAs, zeigen allerdings eine FDR von 20%. Eine Signifikanz ist also in keinem Fall gegeben.

### 5.1.3 Einige miRNAs besitzen eine prognostische Aussagekraft bei Patienten mit Diagnose DLBCL

Neben der Diagnostik kann auch die Prognose des Krankheitsverlaufs durch den Expressionsstatus einzelner miRNAs definiert werden<sup>217</sup>. Dies ist besonders bei einer Erkrankung wie DLBCL wichtig, da diese typischerweise eine ungünstige Prognose hat. Da eine Unterteilung in die beiden Subgruppen GCB- und non-GCB mittels miRNA-Expressionslevel nicht möglich war (siehe 4.1.5), diese beiden Gruppen normalerweise aber mit unterschiedlichen Überlebenswahrscheinlichkeiten assoziiert sind, wurde im Weiteren allgemein nach miRNAs gesucht, die einen Einfluss auf das EFS bzw. OS haben. Dazu wurden multivariate Analysen für beide Parameter durchgeführt. Nach Adjustierung auf die IPI-Faktoren konnten acht miRNAs als prognostisch relevant identifiziert werden. Dabei waren reduzierte Expressionslevel von sechs miRNAs (miR-19a, miR-21, miR-23a, miR-27a, miR-34a und miR-127) für ein schlechteres EFS und/oder OS verantwortlich, während für die restlichen zwei miRNAs (miR-195 und let-7g) das Gegenteil der Fall war. Nur miR-127 beeinflusste sowohl das OS als auch das EFS in einer multivariaten Analyse signifikant. Eine Herabregulation des Expressionslevels korrelierte für beide Parameter mit einer schlechteren Überlebensprognose. Passend dazu wurde beschrieben, dass miR-127 in Tumorzellen methyliert ist und sich das Expressionslevel umgekehrt proportional zur BCL6-Expression, einem bekannten Protoonkogen, verhält<sup>218</sup>. Es scheint also möglich zu sein, dass miR-127 als Tumorsuppressor in der Zelle fungiert. Der gleiche Effekt ist ebenfalls für die p53-regulierende miR-34a be-

kannt<sup>219-223</sup>. Zudem konnte die außergewöhnliche Rolle der miR-21 während der Entwicklung von Krebs, durch den Nachweis einer Korrelation zwischen niedrigem Expressionslevel und reduziertem OS, bestätigt werden. MiR-21 ist mit dem Tumorwachstum, der Invasion und der Metastasierung, durch die Regulation bekannter Tumor- und Metastasierungssuppressorgene wie PDCD4, TPM1 und PTEN, assoziiert<sup>224-230</sup>. Sie ist in einer Vielzahl von Krebsarten differentiell exprimiert und mit schlechtem Überleben und Therapieansprechen, durch die Regulation verschiedener Antikrebsmedikamente, assoziiert<sup>128,137,194,195,198,205,206,209,215,231-235</sup>. Erstaunlicherweise korreliert nur bei zwei miRNAs, miR-195 und let-7g, das verringerte Expressionslevel mit einer besseren Prognose. Diese beiden miRNAs scheinen somit als Onkogene zu agieren. Dies wird durch nachgewiesene Überexpressionen in CLL bzw. Colonkarzinomen bestätigt<sup>236,237</sup>. Interessanterweise wurde miR-155 nicht als prognostischer Marker für das Überleben im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und das, obwohl sie als ausschließlich in ABC-DLBCL überexprimiert ist<sup>190</sup>. Diese Untergruppe ist normalerweise mit einem deutlich ungünstigeren Krankheitsverlauf und einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 30%, im Vergleich zu GCB-DLBCL mit 59% und PMBCL mit 64%, assoziiert<sup>165,176,238</sup>.

In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung ist es Lawrie *et al.* gelungen, verschiedene in DLBCLs dysregulierte miRNAs im Serum von Patienten nachzuweisen<sup>189</sup>. Dazu gehören miR-21, miR-155 und miR-210. Damit ergibt sich eine einfache Möglichkeit der Verlaufskontrolle während einer Behandlung, die in Zukunft um die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen miRNAs erweitert werden könnte.

## 5.2 Funktionelle Analysen der miRNA-205

### 5.2.1 MiRNA-205 wird hauptsächlich in Epithelzellen exprimiert

Beim Vergleich von malignem mit normalem Gewebe spielt die Wahl des geeigneten Referenzgewebes stets eine entscheidende Rolle. Nur so kann gewährleistet werden, dass die Differenzen zwischen „krank“ und „gesund“ wirklich auf eine Dysregulation durch eine Krankheit zurückzuführen sind und nicht auf den Vergleich unterschiedlicher Gewebe. Schon bei der Erstellung von mRNA-Expressionsprofilen für bestimmte Krankheiten war die korrekte Auswahl von eminenter Wichtigkeit, bei miRNA-Profilen verstärkte sich dies aber noch. Besonders bei der Detektion mittels quantitativen RT-PCRs führen selbst kleinste Kontaminatio-

nen mit Fremdgewebe zu massiven Änderungen der Expressionsprofile und ein Vergleich ist dann nur noch eingeschränkt bzw. nicht mehr möglich.

Aus diesem Grund wurden verschiedene lymphatische Organe auf ihre Tauglichkeit als Referenzgewebe für den Vergleich mit DLBCLs und FLs untersucht. Dazu wurden von Tonsillen und Lymphknoten die Expressionslevel von 157 miRNAs miteinander verglichen. Wie zu erwarten war die Mehrzahl der miRNAs etwa gleich stark in beiden Geweben exprimiert, nur miR-205 und miR-203 zeigten sehr deutliche Unterschiede. Beide miRNAs waren in den Lymphknoten nicht nachweisbar, während in den Tonsillen eine sehr starke Expression zu finden war (siehe 4.2.1). Wie sich in nachfolgenden Untersuchungen herausstellte, handelte es sich bei miR-205 um eine miRNA, die hauptsächlich in Epithelzellen exprimiert wird (siehe 4.2.2 und 4.2.3). Bei der in den Tonsillen nachgewiesenen Expression von miR-205 handelte es sich also um „Kontaminationen“ mit epitheliale Gewebe. Dieses Ergebnis entspricht auch Untersuchungen anderer Gruppen. So konnten Ryan *et al.* eine sehr starke Expression der miR-205 in Hornhautepithelien des Auges, im Fußballen, in der Zunge und der Epidermis von Mäusen nachweisen<sup>185</sup>. Auch konnte eine Anreicherung von miR-205 in Vorläuferzellen der Brustepithelien von Mäusen, während der Hautmorphogenese in Zellkulturen sowie im Entoderm und Ectoderm von Hühnerembryonen detektiert werden<sup>186,191,196</sup>. Schlussendlich war es Baskerville & Bartel möglich, eine bevorzugte Expression in Brust- und Thymusepithelzellen nachzuweisen<sup>187</sup>.

Diese Ergebnisse hatten zur Folge, dass sich für Lymphknoten als Referenzgewebe für die Untersuchungen von DLBCL und FL entschieden wurden. Bei diesen war eine Kontamination mit Epithelgewebe nahezu ausgeschlossen. Andere Gruppen, die ebenfalls B-Zell-Erkrankungen untersucht haben, entschieden sich oft für aufgereinigte B-Zellen<sup>188-190</sup>. Dies hat den Vorteil, dass wirklich nur B-Zellen miteinander verglichen wurden, denn auch Lymphknoten bestehen aus einem Konglomerat von verschiedenen Zelltypen. Für nachfolgende Untersuchungen sollte diese Variante in Betracht gezogen werden, obwohl es einen deutlich höheren Arbeitsaufwand bedeutet.

### 5.2.2 MiRNA-205 wird sehr stark in den meisten Karzinomzellen exprimiert

Da Karzinomzellen ihren Ursprung im epithelialen Gewebe haben, wurden in einem weiteren Schritt verschiedene maligne Proben untersucht und mit der durchschnittlichen miR-205 Expression von Organen mit starker Expression verglichen. Die Gewebe gehörten zu den Adenokarzinomen, Plattenepithelkarzinomen, Übergangsepithelkarzinomen und Basalzellkarzinomen. Diese stammen ursprünglich von verschiedenen epithelialen Zellen ab.

Die Analysen ergaben ein recht einheitliches Bild der miR-205 Expressionsstärken für drei der Entitäten. So konnten für Übergangsepithel-, Plattenepithel- und Basalzellkarzinome miR-205 Expressionen nachgewiesen werden, die ziemlich genau den Werten entsprachen, welche für die, in die Untersuchungen mit einbezogenen, Organe ermittelt wurden. Sowohl bei den Organen als auch bei den drei Karzinomentitäten liegt ein sehr hoher Anteil von Zellen mit epithelialeem Ursprung vor. Dadurch ist dieser hohe und sehr gleichmäßige miR-205 Expressionsstatus erklärbar. Die Adenokarzinome fielen im Vergleich zu den anderen untersuchten Untergruppen mit ihrem deutlich geringeren durchschnittlichen Expressionslevel und einer sehr breiten Streuung der Ergebnisse aus dem Rahmen. Dies könnte eventuell daran liegen, dass Adenokarzinomzellen ursprünglich vom Drüsenepithel der Schleimhäute, Leber, Niere sowie in exokrinen und endokrinen Drüsen abstammen. Sie haben also eine andere Funktion als die ursprünglichen Zellen der übrigen untersuchten Karzinomentitäten.

Auch andere Arbeitsgruppen haben die Expression von miRNAs in Karzinomen untersucht und mit gesundem Gewebe verglichen. Dabei zeigte sich ein sehr uneinheitliches Bild der miR-205 Expression. Eine Überexpression konnten in Kopf- und Halstumorzelllinien, dem endometrioiden Typ von Ovarial- und Blasenkarzinomen nachgewiesen werden<sup>193-195</sup>. Erst kürzlich wurde zudem von Wang *et al.* eine Überexpression sowohl in Geweben mit Zervixkarzinomen als auch in Zelllinien dieses Ursprungs gezeigt<sup>192</sup>. Ein völlig anderes Bild wurde allerdings ebenfalls in einer Reihe von Untersuchungen beschrieben. So konnte in Adeno- und Plattenepithelkarzinomen sowie diversen Karzinomzelllinien eine geringere miR-205 Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden<sup>194,197,198</sup>. Diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse lassen Vermutungen über die Funktion der miR-205 während der Karzinogenese aufgrund des Expressionsmusters nur schwer zu. Die detektierten Überexpressionen sind aber wahrscheinlich wiederum auf die Zunahme von Zellen mit epithelialeem Ursprung im Vergleich zu gesundem Gewebe zurückzuführen. Und auch die geringere Expression

in Adenokarzinomen entspricht den hier aufgeführten Ergebnissen, während dies für Plattenepithelkarzinome nicht bestätigt werden konnte. Problematisch an den hier dargestellten Expressionsanalysen ist, dass kein direkter Vergleich zwischen gesundem und krankem Gewebe stattgefunden hat. Dies müsste in nachfolgenden Untersuchungen geändert werden.

In weiteren Untersuchungen konnte in dieser Arbeit zudem gezeigt werden, dass die starke und spezifische miR-205 Expression auch für den Nachweis der Metastasierung eines primären Tumors geeignet ist. So konnte sowohl in einem Lymphknoten mit Metastase als auch in einem Sentinellymphknoten mit Mikrometastase eine miR-205 Expression nachgewiesen werden. Der sehr sensitive, PCR-basierte Nachweis einzelner miRNAs für die Diagnose bzw. die Verlaufskontrolle der Behandlung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bereits genutzt. So war es Lawrie *et al.* möglich, miRNAs, die eine signifikante Dysregulation gegenüber gesundem Gewebe zeigen, im Serum von Patienten mit der Diagnose DLBCL nachzuweisen<sup>189</sup>. Auch für die Diagnose eines Ovarialkarzinoms konnten entsprechende miRNAs in peripher zirkulierenden Exosomen genutzt werden<sup>199</sup>. Es sollte in Zukunft also möglich sein, miRNAs zu diagnostischen Zwecken nutzen zu können ohne größere operative Eingriffe durchführen zu müssen. Eine Untersuchung in wieweit die miR-205 ebenfalls in der Lymphe bzw. dem Blut des Patienten nachweisbar ist, wäre ein zukünftiger Ansatz für die Vereinfachung der Diagnose von Karzinomen bzw. Metastasen.

### 5.2.3 Die miRNA-205 Expression hat eine regulatorische Wirkung auf die Expression von miR-203 und miR-184

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist wenig über die Regulationsmechanismen der miRNA-Expression bekannt. Da die Transkription der primären miRNA durch die Pol II erfolgen, ist davon auszugehen, dass auch die entsprechenden Regulatoren, z.B. Transkriptionsfaktoren, wirken. Dies trifft vor allem für die miRNAs zu, die in Introns codiert sind. Durch die ähnliche Struktur der pri- und pre-miRNA, im Vergleich zu einer mRNA, ist es zudem auch eine Steuerung der Translation durch miRNAs anzunehmen. Dies kann zum einen autoregulatorisch aber auch durch andere miRNAs erfolgen. Solche Mechanismen sind auf mRNA-Ebene seit längerem bekannt und nachgewiesen. Schwierig bei solchen Untersuchungen auf miRNA-Ebene ist, dass wenig über die Länge und Struktur der möglichen 3'UTRs von miRNAs dokumentiert ist. So ist eine computergestützte Vorabanalyse mit einem großen Unsicherheitsfaktor verbunden.

Durch solche bioinformatischen Untersuchungen wurden in zwei putativen Ziel-miRNAs der miR-205, miR-203 und miR-184, eine bzw. zwei *seed*-Sequenzen gefunden (siehe 4.2.9.2). Diese beiden miRNAs zeigten als einzige der quantifizierten miRNAs eine stärkere Expression nach transientem Einbringen der miR-205 in HEK-293 Zellen (siehe 4.2.9.1). Beide miRNAs konnten in unbehandelten Zellen nicht nachgewiesen werden. Die miR-205 Überexpression führte bei miR-203 zu einer Änderung der Expression um das 19-fache und bei miR-184 sogar um das 128-fache. Ein verstärktes Vorkommen einer miRNA hat somit einen Einfluss auf die Menge von anderen, reifen miRNAs. Da die Bindung einer miRNA an die 3'UTR des Zielgens zu einer Reduktion der Proteinmenge führt, die Menge an miRNAs sich dagegen erhöht, erfolgt die Regulation wahrscheinlich nicht durch die selben Mechanismen. Eine Variante wäre, dass die Steuerung indirekt, durch die negative Regulation von Repressoren oder Ähnlichem, erfolgt. Bei einer direkten Steuerung, durch das Vorhandensein der *seed*-Sequenzen eine andere Variante der Regulation, würde die Bindung einer miRNA in einer mutmaßlichen 3'UTR zu einer erhöhten Reifung einer anderer miRNA führen. Dass eine sehr feine Abstimmung der exprimierten miRNAs in einer Zelle erfolgen muss und diese sich dabei auch gegenseitig regulieren, ist wahrscheinlich und für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen essentiell. Wie genau dies von statten geht, muss in zukünftigen Versuchen experimentell untersucht werden.

Betrachtet man die beiden dysregulierten miRNAs näher fällt auf, dass die Expression von miR-203, zusammen mit der von miR-205, in Blasenkrebs herauf reguliert ist<sup>193</sup>. Auch fanden Iorio *et al.* in Ovarialkarzinomen eine gemeinsame Überexpression der beiden miRNAs, die durch eine DNA-Hypomethylierung verursacht wurde<sup>194</sup>. Der umgekehrte Fall wurde für Plattenepithel- und Adenokarzinome beschrieben, wo beide miRNAs durch eine verstärkte Methylierung weniger stark exprimiert werden<sup>198,241</sup>. Anscheinend handelt es sich bei miR-203, wie auch bei miR-205, um eine epithelspezifische miRNA. Zudem scheinen beide miRNAs gemeinsam reguliert zu werden, obwohl sie nicht auf demselben Chromosom lokalisiert sind (siehe 4.2.9.2). Diese Annahme wird auch durch die hier präsentierten Ergebnissen unterstützt, da miR-203, neben miR-205, den stärkste Expressionsunterschied zwischen Tonsille (mit Epithel) und Lymphknoten (ohne Epithel) zeigte (siehe 4.2.1). Auch bei miR-184 scheint es sich um eine miRNA zu handeln, die hauptsächlich in den Epithelien exprimiert wird. So fanden Ryan *et al.* die höchsten Hybridisierungssignale in der Hornhaut und der Linse von Mausaugen<sup>185</sup>. Zudem konnte in Plattenepithelkarzinomen, im Gegensatz zu miR-203 und -205, ein erhöhtes Expressionslevel der miR-184 nachgewiesen werden<sup>243</sup>.

#### 5.2.4 Die Überexpression von miRNA-205 führt zur Inhibition des Zellzyklus

Um über die Aufgabe von miR-205 im Epithel näheres zu erfahren, wurden nach dieser Reihe von deskriptiven Beschreibungen über das Expressionsmuster auch funktionelle Analysen durchgeführt. Dazu wurde in eine Reihe von Zelllinien miR-205 künstlich überexprimiert bzw. die endogene Expression inhibiert und anschließend die Zahl lebender Zellen gemessen. Außerdem wurde das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen in diesen Ansätzen analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die übermäßige miR-205 Expression in allen Fällen zu einer Verringerung der Zahl lebender Zellen führte (siehe 4.2.11). Da sich gleichzeitig das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen nicht bzw. nur unwesentlich änderte, kann man davon ausgehen, dass die Überexpression von miR-205 zu einer Inhibition der Zellproliferation führt (siehe 4.2.12). Zur Untermauerung dieses Ergebnisses konnte in weiteren Experimenten nachgewiesen werden, dass die Hemmung der endogen exprimierten miR-205 zu einer Erhöhung der Zahl lebender Zellen in den jeweiligen Ansätzen führte (siehe 4.2.11). Passend dazu berichteten Lena *et al.* und Yi *et al.*, dass miR-203, deren Expressionsverhalten mit dem von miR-205 korreliert (siehe 4.2.9.1), die epidermale Differenzierung durch die Hemmung der Proliferation und das Stoppen des Zellzyklus fördert<sup>240,242</sup>. Des Weiteren beschrieben Wong *et al.* einen ähnlich gelagerten Effekt für miR-184, der zweiten durch miR-205 regulierten miRNA<sup>243</sup>. Eine Inhibition der miR-184 Expression führte in den von ihnen durchgeführten Untersuchungen zu einer reduzierten Proliferation der Zellen. Bei diesem genau umgekehrten Effekt zu miR-203 und -205 könnte es sich eventuell um einen Regulationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Zellkonstanz handeln, was die Überexpression von miR-184 nach dem transienten Einbringen von miR-205 erklären würde (siehe 4.2.9.1).

Gregory *et al.* führten ebenfalls Untersuchungen über die Funktion von miR-205 durch<sup>191</sup>. Dabei fanden sie, dass diese die Expression von ZEB1 und SIP1 negativ reguliert. Beide Proteine sind im Zusammenhang mit der epithelialen zu mesenchymalen Transition bekannt. Eine Inhibition der miR-205 Expression führte zur Transition der Epithelzellen, während der gegenteilige Effekt bei einer Überexpression in Mesenchymzellen zu beobachten war. Die Autoren schlossen daraus, dass miR-205, zusammen mit anderen miRNAs, in die Etablierung von Epithelzellen während der frühen Entwicklung involviert ist und die Herabregulation ein wichtiger Schritt für eine Metastasierung zu sein scheint. Passend dazu wurde in Zelllinien mit einem hohen Invasionsgrad und einem eher mesenchymalen Typ eine niedrige bis gar

keine miR-205 Expression gefunden. Diese Beobachtungen konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, wobei die T24 Zelllinie (keine endogene miR-205 Expression) ein sehr starkes, die KU-19-19 Zelllinie (starke endogene miR-205 Expression) dagegen ein sehr langsames Wachstum zeigte (Daten nicht aufgeführt).

Die Expression von miR-205 scheint also, zusammen mit der von miR-203 und anderen, für die Etablierung und Aufrechterhaltung von Epithelzellen im Organismus verantwortlich zu sein. Dies scheint primär durch eine Inhibition der Proliferation zu erfolgen, sekundär durch die Regulation der in die Entstehung des Epithelstatus involvierten mRNAs oder Proteine. Dies erklärt zudem die Anreicherung von miR-205 in den Vorläuferzellen der Brustepithelien von Mäusen, während der Hautmorphogenese in Zellkulturen sowie im Entoderm und Ectoderm von Hühnerembryonen<sup>186,191,196</sup>. Auch die von Ryan *et al.* und im Rahmen dieser Arbeit gefundene starke Expression in diversen Epithelien ist in ihrer aufrechterhaltenden Funktion begründet (siehe 4.2.2 und 4.2.3)<sup>185</sup>. Die sehr unterschiedliche und inhomogene miR-205 Verteilung in den diversen untersuchten Karzinomen ist dagegen eher auf ihren Invasionsstatus zurückzuführen. Die untersuchten Karzinome mit einem hohen Metastasierungspotential zeichnen sich dabei wohl eher durch eine geringe oder keine miR-205 Expression aus, während das Gegenteil bei einer verringerten Neigung zur Metastasierung der Fall ist. In jedem Fall sind weitere experimentellen Untersuchungen über die Funktion von miR-205 in der Zelle bzw. während der Karzinogenese notwendig. Wichtig wäre dabei besonders, von den hier genutzten HEK-293 Zellen auf eine Zelllinie epidermalen Ursprungs umzusteigen. Eventuell wäre es auch sinnvoll, anstatt der eher ungenauen Auszählung der lebenden und toten Zellen in einem Ansatz, ein sensitiveres System zu nutzen. Dabei würde sich besonders der Einsatz des Thymidinanalogs BrdU anbieten, mit dem eine genaue Messung der Zellen möglich ist, die in die S-Phase der Mitose übergegangen sind.

### 5.2.5 Die Regulation von ARTS und INPPL1 erfolgt direkt durch miR-NA-205

Abschließend wurde versucht, Zielgene zu finden, die von miR-205 negativ reguliert werden. Dazu wurden in verschiedenen Experimenten untersucht, in wieweit sich das mRNA bzw. Proteinlevel nach dem transienten Einbringen von miR-205 in Zellen ändert. Anschließend wurde noch nach direkten Interaktionspartnern von miR-205 gesucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigten besonders ARTS und INPPL1 eine auffällige Regulation durch miR-

205. So konnte auf mRNA-Ebene eine Verringerung beider Expressionslevel nach Transfektion nachgewiesen werden, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität (siehe 4.2.13.2). Auf Proteinebene konnte dagegen nur für ARTS eine eindeutige Herabregulation detektiert werden, was womöglich an der geringeren Sensitivität des Western Blots gegenüber quantitativen RT-PCRs liegt (siehe 4.2.14.2). Für beide Zielgene konnte in einem schlussendlich durchgeführten Luciferase-Assay eine direkte Regulation durch miR-205 gezeigt werden (siehe 4.2.15.2).

Betrachtet man die bekannten Funktionen beider Zielgene näher, fällt auf, dass ARTS eine wichtige Rolle in der Induktion und Förderung der Apoptose spielt<sup>244</sup>. Dazu passt auch, dass im Rahmen einer Studie in mehr als 70% der Fälle von kindlicher akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) ein kompletter Verlust der ARTS-Expression nachgewiesen wurde und die Autoren deswegen mutmaßten, es könnte sich um einen Tumorsuppressor in der Zelle handeln<sup>245</sup>. Im Gegensatz dazu beschrieben Tanaka *et al.*, dass der Verlust einer relativ hohen ARTS-Expression in Colonkarzinomzelllinien zu einer signifikanten Wachstumsinhibition und Arretierung im G2-Stadium der Mitose führte<sup>239</sup>. Diese Beschreibung stimmt ziemlich gut mit denen im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen überein. Das künstliche Einbringen von miR-205 in die Zellen führte in den Versuchen zu einer Inhibition der ARTS-Expression, die wiederum zu einer Inhibition des Zellwachstums führte (siehe 4.2.11, 4.2.13.2, 4.2.14.2.2 und 4.2.15.2).

Auch über INPPL1 sind bereits einige Funktionen in der Zelle beschrieben. Prasad *et al.* wiesen eine erhöhte Expression in diversen Brustkrebszelllinien nach<sup>246</sup>. Diese führte dabei zu einer gesteigerten Zellproliferation *in vitro* sowie einer Förderung der Krebsentwicklung und Metastasierung in Nacktmäusen. Gegenteilige Beobachtungen machten dagegen Giuriato *et al.* bei ihrer Untersuchung von, aus chronisch myeloischen Leukämien (CML) etablierten, Zelllinien<sup>247</sup>. Sie konnten zwar ebenfalls eine starke INPPL1-Expression in den Zellen nachweisen, allerdings führte eine Überexpression zu einer starken Absenkung der Proliferationsrate durch eine Akkumulation der Zellen in der G2-Phase der Mitose. Die in dieser Arbeit präsentierten Beobachtungen passen eher zu den von Prasad *et al.* beschriebenen Ergebnissen. Wobei hier die Inhibition von INPPL1, durch eine Überexpression von miR-205, zu einer Reduktion der Zellproliferation führte, während Prasad *et al.* die Überexpression mit einem gesteigerten Wachstum der Zellen in Verbindung brachten. In jedem Fall sind weitere experi-

mentelle Analysen sowohl auf miRNA- als auch auf Proteinebene notwendig um das komplizierte Regulationsnetzwerk des Zellwachstums besser verstehen zu können.

Interessant wäre es in nachfolgenden Experimenten miR-205 mit miR-203 und/oder miR-184 in Zellen einzubringen bzw. die endogene Expression zu inhibieren. Dadurch sollten stärkere Effekte z.B. auf Proteinebene nachweisbar sein. Auch könnte man mehr über die „Zusammenarbeit“ verschiedener miRNAs erfahren. Natürlich ist es auch immer von Interesse weitere Zielgene von miR-205 ausfindig zu machen um das Steuerungs-Netzwerk der Zellproliferation um weitere Aspekte zu erweitern. Abschließend sollten auch durch Versuche nachgewiesen werden, wie genau die Inhibition der Zellproliferation durch die miR-205 erfolgt. Vermutlich passiert dies, wie für miR-203 schon nachgewiesen, während der G2-Phase der Mitose, ein experimenteller Nachweis wäre aber notwendig. Dadurch könnte es auch einfacher sein, weitere mutmaßliche Zielgene von miR-205 vorherzusagen, deren Regulation anschließend bewiesen werden könnte.

## 6 Literatur

- 1 Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: Molecular Biology of the Cell. Garland Science, 2002, 0-8153-4072-9.
- 2 Seyffert, W., Gassen, H.G., Hess, O., Fischbach, K.-F.: Lehrbuch der Genetik. Gustav Fischer Verlag, 1998, 3-437-25610-6.
- 3 Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.E.: Molekulare Zellbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, 2001, 3-8274-1077-0.
- 4 Knippers, R.: Molekulare Genetik. 8 Stuttgart, Thieme Verlag, 2001, 3-13-477008-3.
- 5 Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C.: A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science. 1999, *286 (5441)*, S.950-2.
- 6 Fire, A. et al.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1998, *391 (6669)*, S.806-11.
- 7 Kim, V.N.: Small RNAs: classification, biogenesis, and function. Mol Cells. 2005, *19*, S.1-15.
- 8 Cao, X. et al.: Noncoding RNAs in the Mammalian Central Nervous System. Annu Rev Neurosci. 2006, *29*, S.77-103.
- 9 Ota, T. et al.: Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. Nature Genetics. 2004, *36*, S.40-45.
- 10 Lee, R.C. & Ambros, V.: An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. Science. 2001, *294*, S.862-864.
- 11 Lau, N.C. et al.: An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. Science. 2001, *294*, S.858-862.
- 12 Lagos-Quintana, M. et al.: Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science. 2001, *294*, S.853-858.
- 13 Griffiths-Jones, S. et al.: miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Nucleic Acids Res. 2006, *34*, S.D140-D144.
- 14 Bartel, D.P.: MicroRNAs. Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell. 2004, *116*, S.281-297.
- 15 Lewis, B.P. et al.: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell. 2005, *120*, S.15-20.

- 
- 16 Berezikov, E. et al.: Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*. 2005, *120*, S.21-24.
- 17 Ambros, V.: The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004, *431*, S.350-355.
- 18 Chalfie, M. et al.: Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell*. 1981, *24*, S.59-69.
- 19 Ambros, V.: A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell*. 1989, *57*, S.49-57.
- 20 Ambros, V. & Horvitz, H.R.: Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1984, *226*, S.409-416.
- 21 Lee, R.C. et al.: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993, *75*, S.843-854.
- 22 Ruvkun, G. & Giusto, J.: The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal development switch. *Nature*. 1989, *338*, S.313-319.
- 23 Wightman, B. et al.: Negative regulatory sequences in the *lin 14* 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev*. 1991, *5*, S.1813-1824.
- 24 Olsen, P.H. & Ambros, V.: The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*. 1999, *216*, S.671-680.
- 25 Ha, I. et al.: A bulged *lin-4/lin-14* RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* *lin-14* temporal gradient formation. *Genes Dev*. 1996, *10*, S.3041-3050.
- 26 Wightman, B. et al.: Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993, *75*, S.855-862.
- 27 Reinhart, B.J. et al.: The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000, *403*, S.901-906.
- 28 Lin, S.Y. et al.: The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. *Dev Cell*. 2003, *4*, S.639-650.
- 29 Abrahante, J.E. et al.: The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. *Dev Cell*. 2003, *4*, S.625-637.
- 30 Slack, F.J. et al.: The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*. 2000, *5*, S.659-669.

- 
- 31 Vella, M.C. et al.: The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev.* 2004, *18*, S.132-137.
- 32 Pasquinelli, A.E. et al.: Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000, *408*, S.86-89.
- 33 Zuker, M.: Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003, *31*, S.3406-3415.
- 34 Lagos-Quintana, M. et al.: Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Curr Biol.* 2002, *12*, S.735-739.
- 35 Lagos-Quintana, M. et al.: New microRNAs from mouse and human. *RNA.* 2003, *9*, S.175-179.
- 36 Mourelatos, Z. et al.: miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 2002, *16*, S.720-728.
- 37 Ambros, V. et al.: MicroRNAs and Other Tiny Endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol.* 2003, *13*, S.807-818.
- 38 Aravin, A.A. et al.: The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell.* 2003, *5*, S.337-350.
- 39 Dostie, J. et al.: Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA.* 2003, *9*, S.180-186.
- 40 Houbaviy, H.B. et al.: Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell.* 2003, *5*, S.351-358.
- 41 Lim, L.P. et al.: The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 2003, *17*, S.991-1008.
- 42 Lim, L.P. et al.: Vertebrate microRNA genes. *Science.* 2003, *299*, S.1540.
- 43 Kim, J. et al.: Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004, *101*, S.360-365.
- 44 Griffiths-Jones, S.: The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* 2004, *32*, S.D109-D111.
- 45 Lee, Y. et al.: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004, *23*, S.4051-4060.
- 46 Wienholds, E. & Plasterk, R.H.: MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* 2005, *579*, S.5911-5922.
- 47 He, L. & Hannon, G.J.: MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004, *5*, S.522-531.
- 48 Lee, Y. et al.: MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002, *21*, S.4663-4670.

- 
- 49 Lee, Y. et al.: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003, *425*, S.415-419.
- 50 Han, J. et al.: The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004, *18*, S.3016-3027.
- 51 Fortin, K.R. et al.: Mouse ribonuclease III: cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. *BMC Genomics*. 2002, *3*, S.26.
- 52 Denli, A.M. et al.: Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004, *432*, S.231-235.
- 53 Gregory, R.I. et al.: The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004, *432*, S.235-240.
- 54 Landthaler, M. et al.: The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*. 2004, *14*, S.2162-2167.
- 55 Zeng, Y. & Cullen, B.R.: Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. *RNA*. 2003, *9*, S.112-123.
- 56 Zeng, Y. et al.: Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J*. 2005, *24*(1), S.138-148.
- 57 Basyuk, E. et al.: Human let-7 stem-loop precursors harbour features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res*. 2003, *31*, S.6593-6597.
- 58 Lund, E. et al.: Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004, *303*, S.95-98.
- 59 Yi, R. et al.: Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003, *17*, S.3011-3016.
- 60 Zeng, Y. & Cullen, B.R.: Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acid Res*. 2004, *32*, S.4776-4785.
- 61 Lee, Y.S. et al.: Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004, *117*, S.69-81.
- 62 Bernstein, E. et al.: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001, *409*, S.363-366.
- 63 Murchinson, E.P. & Hannon, G.J.: miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol*. 2004, *16*, S.223-229.
- 64 Song, J.J. et al.: The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*. 2003, *10*, S.1026-1032.

- 
- 65 Carmell, M.A. & Hannon, G.J.: RNase III enzyme and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol.* 2004, *11*, S.214-218.
- 66 Zhang, H. et al.: Single processing center models for human Dicer and bacterial Rnase III. *Cell.* 2004, *118*, S.57-68.
- 67 Khvorova, A. et al.: Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 2003, *115*, S.209-216.
- 68 Schwarz, D.S. et al.: Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 2003, *115*, S.199-208.
- 69 Chendrimada, T.P. et al.: TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005, *436*(7051), S.740-744.
- 70 Gregory, R.I. et al.: Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 2005, *123*, S.631-640.
- 71 Saito, K. et al.: Processing of pre-microRNAs by Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol.* 2005, *3*, S.e235.
- 72 Tabara, H. et al.: The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell.* 2002, *109*, S.861-871.
- 73 Hutvagner, G. & Zamore, P.D.: A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science.* 2002, *297*, S.2056-2060.
- 74 Volpe, T.A. et al.: Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science.* 2002, *297*, S.1833-1837.
- 75 Morris, K.V. et al.: Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science.* 2004, *305*, S.1289-1292.
- 76 Grishok, A. et al.: Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell.* 2001, *106*, S.23-34.
- 77 Tahbaz, N. et al.: Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep.* 2004, *5*, S.189-194.
- 78 Sen, G.L., & Blau, H.M.: Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol.* 2005, *7*, S.1161-1166.
- 79 Liu, J. et al.: A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol.* 2005, *7*, S.1161-1166.
- 80 Liu, J. et al.: MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol.* 2005, *7*, S.719-723.

- 
- 81 Sheth, U. & Parker, R.: Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*. 2003, *300*, S.805-808.
- 82 Llave, C. et al.: Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*. 2002, *297*, S.2053-2056.
- 83 Rhoades, M.W. et al.: Prediction of plant microRNA targets. *Cell*. 2002, *110*, S.513-520.
- 84 Mansfield, J.H. et al.: MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet*. 2004, *36*, S.1079-1083.
- 85 Yekta, S. et al.: MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004, *304*, S.594-596.
- 86 Zeng, Y. et al.: Both natural and designed microRNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*. 2002, *9*, S.1327-1333.
- 87 Doench, J.G. et al.: siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*. 2003, *17*, S.438-442.
- 88 Pillai, R.S. et al.: Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 2005, *309*, S.1573-1576.
- 89 Valencia-Sanchez, M.A. et al.: Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*. 2006, *20*, S.515-524.
- 90 Lewis, B.P. et al.: Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003, *115*, S.787-798.
- 91 Stark, A. et al.: Identification of Drosophila MicroRNA Targets. *PLoS Biol*. 2003, *1*, S.E60.
- 92 Enright, A.J. et al.: MicroRNA targets in Drosophila. *Genome Biol*. 2003, *5*, S.R1.
- 93 Brennecke, J. et al.: Principles of MicroRNA-Target Recognition. *PLoS Biol*. 2005, *3*, S.e85.
- 94 Li, S.C., Tang, P., Lin, W.C.: Intronic microRNA: discovery and biological implications. *DNA Cell Biol*. 2007, *26(4)*, S.195-207.
- 95 Bernstein, E. et al.: Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*. 2003, *35(3)*, S.215-217.
- 96 Petersen, C.P. et al.: Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells *Mol Cell*. 2006, *21(4)*, S.533-542.
- 97 Thermann, R. & Hentze, M.W.: Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature*. 2007, *447(7146)*, S.875-878.
- 98 Lim, L.P. et al.: Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005, *433(7027)*, S.769-773.
- 99 Bagga, S. et al.: Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 2005, *122(4)*, S.553-563.

- 
- 100 Schmitter, D. et al.: Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293. *Nucleic Acids Res.* 2006, *34(17)*, S.4801-4815.
- 101 Wu, L. et al.: MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006, *103(11)*, S.4034-4039.
- 102 Giraldez, A.J. et al.: Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science.* 2006, *312(5770)*, S.75-79.
- 103 Sheth, U. & Parker, R.: Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science.* 2003, *300(5620)*, S.805-808.
- 104 Doench, J.G. & Sharp, P.A.: Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 2004, *18(5)*, S.504-511.
- 105 Kiriakidou, M. et al.: A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev.* 2004, *18(10)*, S.1165-1178.
- 106 Rajewsky, N.: microRNA target predictions in animals. *Nat Genet.* 2006, *38 Suppl.*, S.S8-S13.
- 107 Miranda, K.C. et al.: A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell.* 2006, *126(6)*, S.1203-1217.
- 108 Krek, A. et al.: Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005, *37(5)*, S.495-500.
- 109 Didiano, D. & Hobert, O.: Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol.* 2006, *13(9)*, S.849-851.
- 110 Stark, A. et al.: Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell.* 2005, *123(6)*, S.1133-1146.
- 111 Robins, H. et al.: Incorporating structure to predict microRNA targets. *Natl Acad Sci USA.* 2005, *102(11)*, S.4006-4009.
- 112 Dalmay, T.: MicroRNAs and cancer. *J Intern Med.* 2008, *263*, S.366-375.
- 113 Eulalio, A. et al.: P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol.* 2007, *27(11)*, S.3970-3981.
- 114 Saxena, S. et al.: Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2003, *278(45)*, S.44312-44319.
- 115 Long, D. et al.: Potent effect of target structure on microRNA function. *Nat Struct Mol Biol.* 2007, *14(4)*, S.287-294.
- 116 Baulcombe, D.: RNA silencing in plants. *Nature.* 2004, *431*, S.356-363.

- 
- 117 Song, L. & Tuan, R.S.: MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006, 78, S.140-149.
- 118 Calin, G.A. et al.: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes mir15 and mir16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002, 99, S.15524-15529.
- 119 Calin, G.A. et al.: Familial cancer association with a polymorphism in ARLTS1. *N Engl J Med*. 2005, 352, S.1667-1676.
- 120 Cimmino, A. et al.: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005, 102, S.13944-13949.
- 121 Lu, J. et al.: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005, 435, S.834-838.
- 122 Murakami, Y. et al.: Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*. 2006, 25, S.2537-2545.
- 123 Bandres, E. et al.: Identification by real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer*. 2006, 5, S.29.
- 124 Calin, G.A. et al.: A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005, 353, S.1793-1801.
- 125 Yanaihara, N. et al.: Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006, 9, S.189-198.
- 126 Chen, C.Z.: MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*. 2005, 353, S.1768-1771.
- 127 Roldo, C. et al.: MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*. 2006, 24, S.4677-4684.
- 128 Lee, E.J. et al.: Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2007, 120, S.1046-1054.
- 129 Calin, G.A. et al.: MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004, 101, S.11755-11760.
- 130 Ramaswamy, S. et al.: Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, 98, S.15149-15154.
- 131 Krutzfeldt, J. et al.: Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005, 438, S.685-689.

- 132 Takamizawa, J. et al.: Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004, *64*, S.3753-3756.
- 133 Johnson, S.M. et al.: RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005, *120*, S.635-647.
- 134 Hayashita, Y. et al.: A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 2005, *65*, S.9628-9632.
- 135 Lewis, B.P. et al.: Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 2003, *115*, S.787-798.
- 136 Michael, M.Z. et al.: Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res.* 2003, *1*, S.882-891.
- 137 Iorio, M.V. et al.: MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005, *65*, S.7065-7070.
- 138 Eis, P.S. et al.: Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005, *25*, S.6170-6175.
- 139 Ma, L. et al.: Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature.* 2007, *449*, S.682-688.
- 140 Yekta, S. et al.: MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science.* 2004, *304*, S.594-596.
- 141 Cao, X. et al.: A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes Dev.* 2007, *21*, S.531-536.
- 142 Chen, C.Z. et al.: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 2004, *303*, S.83-86.
- 143 Naguibneva, I. et al.: The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol.* 2006, *8*, S.278-284.
- 144 Poy, M.N. et al.: A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature.* 2004, *432*, S.226-230.
- 145 Jaffe, et al.: World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press. 2001.
- 146 Feugier, P. et al.: Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol.* 2005, *23*, S.4117-4126.
- 147 Armitage, J.O., Weisenburger, D.D.: New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. *J Clin Oncol.* 1998, *16*, S.2780-2795.
- 148 Pfreundschuh, M. et al.: CHOP-like chemotherapy plus ritoximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large B-cell lymphoma: a randomised

- controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2006, *7*, S.379-391.
- 149 Sehn, L.H., Donaldson, J.: Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol.* 2005, *23*, S.5027-5033.
- 150 Dave, S.S. et al.: Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med.* 2004, *351*, S.2159-2169.
- 151 Gascoyne, R.D.: Hematopathology approaches to diagnosis and prognosis of indolent B-cell lymphomas. *Hematology.* 2005, S.299-306.
- 152 The International Non-Hodgkin Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1993, *329*, S.987-994.
- 153 Solal-Celigny, P. et al.: Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood.* 2004, *104*, S.1258-1265.
- 154 Al-Tourah, A. et al.: Incidence, predictive factors and outcome of transformed lymphoma; a population-based study from British Columbia. *Ann Oncol.* 2005, *16*:v64.
- 155 Marcus, R. et al.: CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood.* 2005, *105*, S.1417-1423.
- 156 Hiddemann, W. et al.: Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood.* 2005, *106*, S.3725-3732.
- 157 Hochster, H.S. et al.: Maintenance rituximab after CVP results in superior clinical outcome in advanced follicular lymphoma: Results of the E1496 phase III trial from the Eastern Cooperative Oncology Group and the Cancer and Leukemia Group B. *Blood.* 2005, *106*, S.106a.
- 158 Ott, G. et al.: Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood.* 2002, *99*, S.3806-3812.
- 159 Akasaka, T., Lossos, I.S., Levy, R.: BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood.* 2003, *102*, S.1443-1448.
- 160 Bilalovic, N. et al.: Expression of bcl-6 and CD10 protein is associated with longer overall survival and time to treatment failure in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2004, *121*, S.34-42.

- 
- 161 Torlakovic, E. et al.: Prognostic significance of PU.1 in follicular lymphoma. *J Pathol.* 2006, *209*, S.352-359.
- 162 Husson, H. et al.: Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. *Blood.* 2002, *99*, S.282-289.
- 163 Johnson, N.A. et al.: Insights into disease evolution of transformed follicular lymphoma derived from cytogenetics. *Blood.* 2003, *102*, S.1443-1448.
- 164 Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* *227(259)*, S.680-685.
- 165 Rosenwald, A. et al.: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002, *346*, S.1937-1947.
- 166 Nanjangud, G. et al.: Spectral karyotyping identifies new rearrangements, translocations, and clinical associations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2002, *99*, S.2554-2561.
- 167 Huang, J.Z. et al.: The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood.* 2002, *99*, S.2285-2290.
- 168 Bea, S. et al.: Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene expression-based survival prediction. *Blood.* 2005, *106*, S.3183-3190.
- 169 Lam, L.T. et al.: Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res.* 2005, *11*, S.28-40.
- 170 Davis, R.E. et al.: Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med.* 2001, *194*, S.1861-1874.
- 171 Pfreundschuh, M. et al.: Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood.* 2004, *104(3)*, S.634-641.
- 172 Pfreundschuh, M. et al.: Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood.* 2004, *104(3)*, S.626-633.
- 173 Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983, *65(1-2)*, S.55-63.
- 174 Sambrook, J. & Russell, D.W.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Laboratory Press, 2000, 978-0879695767.

- 175 Livak, K.J. et al.: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995, *4(6)*, S.357-362.
- 176 Alizadeh, A.A. et al.: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 2000, *403(6769)*, S.503-511.
- 177 Cowland, J.B. et al.: MicroRNAs and cancer. *APMIS.* 2007, *115*, S.1090-1106.
- 178 Landgraf, P. et al.: A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell.* 2007, *129*, S.1401-1414.
- 179 Grün, D. et al.: MicroRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets. *PLoS Comp Biol.* 2005, *1(1)*, S.e13.
- 180 Seggerson, K. et al.: Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol.* 2002, *243*, S.215-225.
- 181 Behm-Ansmant, I. et al.: A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO.* 2007, *26*, S.1591-1601.
- 182 Eulalio, A. et al.: Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev.* 2007, *21*, S.2558-2570.
- 183 Kiriakidou, M. et al.: A combined computational approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev.* 2004, *18(10)*, S.1165-1178.
- 184 Lewis, B.P. et al.: Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 2003, *115(7)*, S.787-798.
- 185 Ryan, D.G. et al.: MicroRNAs of the mammalian eye display distinct and overlapping tissue specificity. *Molecular Vision.* 2006, *12*, S.1175-1184.
- 186 Ibarra, I. et al.: A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. *Genes Dev.* 2007, *21*, S.3238-3243.
- 187 Baskerville, S. & Bartel, D.P.: Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA.* 2005, *11*, S.241-247.
- 188 Akao, Y. et al.: Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. *Cancer Sci.* 2007, *98(12)*, S.1914-1920.
- 189 Lawrie, C.H. et al.: Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008, *141(5)*, S.672-675.
- 190 Eis, P.S. et al.: Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005, *102(10)*, S.3627-3632.

- 
- 191 Gregory, P.A. et al.: The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008, *10(5)*, S.593-601.
- 192 Wang, X. et al.: Aberrant Expression of Oncogenic and Tumor-Suppressive MicroRNAs in Cervical Cancer Is Required for Cancer Cell Growth. *PLoS ONE.* 2008, *3(7)*, S.e2557.
- 193 Gottardo, F. et al.: Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol.* 2007, *25(5)*, S.387-392.
- 194 Iorio, M.V. et al.: MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 2007, *67(18)*, S.8699-8707.
- 195 Tran, N. et al.: MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007, *358(1)*, S.12-17.
- 196 Darnell, D.K. et al.: MicroRNA expression during chick embryo development. *Dev Dyn.* 2006, *235*, S.3156-3165.
- 197 Sempere, L.F. et al.: Altered MicroRNA Expression Confined to Specific Epithelial Cell Subpopulations in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2007, *67(24)*, S.11612-11620.
- 198 Feber, A. et al.: MicroRNA expression profiles of oesophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008, *135(2)*, S.255-260.
- 199 Taylor, D.D. & Gercel-Taylor, C.: MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008, *110(1)*, S.13-21.
- 200 Rodriguez, A. et al.: Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science.* 2007, *346*, S.608-611.
- 201 Thai, T.H. et al.: Regulation of the germinal center response by microRNA-155 *Science.* 2007, *316*, S.604-608.
- 202 Costinean, S. et al.: Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006, *103*, S.7024-7029.
- 203 Van den Berg, A. et al.: High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003, *37*, S.20-28.
- 204 Kluiver, J. et al.: BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol.* 2005, *207*, S.243-249.
- 205 Volinia, S. et al.: A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006, *103*, S.2257-2261.

- 206 Lawrie, C.H. et al.: MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2007, *121*, S.1156-1161.
- 207 Rai, D. et al.: Coordinated expression of microRNA-155 and predicted target genes in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008, *181*, S.8-15.
- 208 Giannakakis, A. et al.: MiR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*. 2007, *7*, S.255-264.
- 209 Fulci, V. et al.: Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007, *109*, S.4944-4951.
- 210 Xiao, C. et al.: MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*. 2007, *131*, S.146-159.
- 211 Zhou, B. et al.: MiR-150, a microRNA in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, *104*, S.7080-7085.
- 212 Debernardi, S. et al.: MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis. *Leukemia*. 2007, *21*, S.912-916.
- 213 Gramantieri, L. et al.: Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2007, *67*, S.6092-6099.
- 214 Sempere, L.F. et al.: Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res*. 2007, *67*, S.11612-11620.
- 215 Slaby, O. et al.: Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. 2007, *72*, S.397-402.
- 216 O'Donnell, K.A. et al.: C-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005, *435*, S.839-843.
- 217 Garzon, R. et al.: MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008, *111*(6), S.3183-3189.
- 218 Saito, Y. et al.: Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 2006, *9*, S.435-443.
- 219 He, L. et al.: A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007, *447*, S.1130-1134.
- 220 Raver-Shapira, N. et al.: Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 2007, *26*, S.731-743.

- 221 Tarasov, V. et al.: Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*. 2007, *6*, S.1586–1593.
- 222 Tazawa, H. et al.: Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, *104*, S.15472-15477.
- 223 Welch, C. et al.: MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2007, *26*, S.5017-5022.
- 224 Chan, J.A. et al.: MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005, *65*, S.6029-6033.
- 225 Cheng, A.M. et al.: Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 2005, *33*, S.1290-1297.
- 226 Löffler, D. et al.: Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*. 2007, *110*, S.1330-1333.
- 227 Meng, F. et al.: MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007, *133*, S.647-658.
- 228 Si, M.L. et al.: MiR-21- mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007, *26*, S.2799–2803.
- 229 Zhu, S. et al.: MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 2007, *282*, S.14328–14336.
- 230 Frankel, L.B. et al.: Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2008, *283*, S.1026-1033.
- 231 Meng, F. et al.: Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 2006, *130*, S.2113-2129.
- 232 Roldo, C. et al.: MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behaviour. *J Clin Oncol*. 2006, *24*, S.4677-4684.
- 233 Lui, W.O. et al.: Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res*. 2007, *67*, S.6031–6043.
- 234 Blower, P.E. et al.: MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells. *Mol Cancer Therapeutics*. 2008, *7*, S.1-9.

- 235 Schetter, A.J. et al.: MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*. 2008, *299*, S.425-436.
- 236 Nakajima, G. et al.: Non-coding MicroRNAs has-let-7g and has-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics Proteomics*. 2006, *3*, S.317-324.
- 237 Zanette, D.L. et al.: MiRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007, *40*, S.1435-1440.
- 238 Rosenwald, A. et al.: Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*. 2003, *198*, S.851-862.
- 239 Tanaka, M. et al.: Impaired expression of a human septin family gene Bradeion inhibits the growth and tumorigenesis of colorectal cancer in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther*. 2002, *9(6)*, S.483-488.
- 240 Yi, R. et al.: A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature*. 2008, *452(7184)*, S.225-229.
- 241 Kozaki, K. et al.: Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*. 2008, *68(7)*, S.2094-2105.
- 242 Lena, A.M. et al.: MiR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ*. 2008, *15(7)*, S.1187-1195.
- 243 Wong, T.S. et al.: Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res*. 2008, *14(9)*, S.2588-2592.
- 244 Larisch, S. et al.: A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat Cell Biol*. 2000, *2(12)*, S.915-921.
- 245 Elhasid, R. et al.: Mitochondrial pro-apoptotic ARTS protein is lost in the majority of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene*. 2004, *23(32)*, S.5468-5475.
- 246 Prasad, N.K. et al.: Phosphoinositol phosphatase SHIP2 promotes cancer development and metastasis coupled with alterations in EGF receptor turnover. *Carcinogenesis*. 2008, *29(1)*, S.25-34.
- 247 Giuriato, S. et al.: SHIP2 overexpression strongly reduces the proliferation rate of K562 erythro-leukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002, *296(1)*, S.106-110.
- 248 Hans, C.P. et al.: Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004, *103*, S.275-282.

## 7 Anhang

### 7.1 Tabellarische Auflistung der Ergebnisse

#### 7.1.1 Nachweis der miRNA-205 Expression

##### 7.1.1.1 *MiRNA-205 Expression in Tonsillen und Lymphknoten*

Tab. 16: Durchschnittswerte der acht miRNAs mit den deutlichsten Expressionsunterschieden beim Vergleich von elf Tonsillen und drei Lymphknoten. Zusätzlich ist auch das miR-16 Level der beiden Gewebetypen aufgeführt.

miRNA	Lymphknoten [Ct-Wert ± Standard]	Tonsille [Ct-Wert ± Standard]
miR-16	28,07 ± 0,76	28,40 ± 0,63
miR-100	37,91 ± 3,63	32,56 ± 0,72
miR-135b	38,77 ± 2,12	34,66 ± 0,58
miR-141	39,27 ± 1,08	34,18 ± 1,16
miR-200a	39,33 ± 0,62	33,82 ± 0,82
miR-200b	39,61 ± 0,68	33,60 ± 0,56
miR-200c	37,41 ± 0,87	31,46 ± 0,78
miR-203	40,00 ± 0,00	31,28 ± 0,69
miR-205	40,00 ± 0,00	29,06 ± 1,06

Tab. 17: Einzelergebnisse der Expressionswerte von miR-203 und miR-205 in den elf untersuchten Tonsillen und drei Lymphknoten. Die Werte wurden auf das miR-16 Level normalisiert.

Gewebe	miR-203 [Ct-Wert]	miR-205 [Ct-Wert]
Lymphknoten 1	40,00	40,00
Lymphknoten 2	40,00	40,00
Lymphknoten 3	40,00	40,00
Tonsille 1	31,91	28,43
Tonsille 2	30,63	27,87
Tonsille 3	31,49	29,54
Tonsille 4	31,75	28,60
Tonsille 5	32,65	29,98
Tonsille 6	30,56	29,32
Tonsille 7	31,63	28,52
Tonsille 8	31,04	29,71
Tonsille 9	30,50	30,50
Tonsille 10	31,24	30,13
Tonsille 11	30,62	27,03

7.1.1.2 *MiR-205 Expression in Organen und Geweben*

Tab. 18: Durchschnittliche miR-205 Expressionslevel in diversen Geweben und Organen. Die angegebenen Werte wurden auf U6 normalisiert.

<b>Gewebe</b>	<b>miR-205 [Ct-Wert ± Standard]</b>
Vulva	20,06 ± 0,39
Tonsille	20,09 ± 0,75
Anus	20,59 ± 1,17
Mundschleimhaut	22,77 ± 0,14
Prostata	22,83 ± 0,11
Mamma	22,86 ± 0,19
Harnblase	23,14 ± 0,09
Ösophagus	23,76 ± 0,18
Portio	24,69 ± 0,08
Bronchus	26,90 ± 0,11
Lunge	27,24 ± 0,24
Muskel	29,17 ± 0,04
Uterus	29,93 ± 0,09
Schilddrüse	31,34 ± 0,34
Colon	32,11 ± 0,18
Niere	32,82 ± 0,53
Knochen	33,43 ± 0,34
Pankreas	33,61 ± 0,52
Magen	33,82 ± 0,23
Ileum	34,93 ± 0,93
Knorpel	34,97 ± 0,02
Fettgewebe	35,06 ± 0,21
Hoden	35,06 ± 0,32
Leber	35,22 ± 0,21
Knochenmark	36,06 ± 1,11
Gehirn	36,18 ± 0,28
Ovar	36,55 ± 0,98
Hypophyse	37,30 ± 0,24
Nebenniere	37,68 ± 0,05
Lymphknoten	40,00 ± 0,00

### 7.1.1.3 MiRNA-205 Expression in mikrodissektierten Organen

Tab. 19: Ergebnisse der quantitativen RT-PCRs von Messungen der miR-205 Expression in epithel- und nicht-epithelhaltigen Geweben nach Mikrodissektion. Die Werte wurden auf das miR-16 Level normalisiert.

Gewebe	Epithelgewebe [Ct-Wert ± Standard]	Nicht-Epithelgewebe [Ct-Wert ± Standard]
Anus	29,38 ± 0,16	37,05 ± 0,96
Tonsille	30,65 ± 1,39	37,90 ± 2,97
Mundschleimhaut	30,37 ± 0,58	35,57 ± 0,69
Prostata	30,99 ± 0,70	35,70 ± 0,57
Harnblase	31,81 ± 1,58	35,82 ± 0,33
Mamma	30,71 ± 0,20	34,32 ± 0,76
Portio	29,73 ± 0,10	33,24 ± 1,11
Uterus	37,06 ± 0,50	40,00 ± 0,00
Vulva	30,73 ± 0,23	33,42 ± 1,10
Ösophagus	30,59 ± 0,06	33,05 ± 0,31

### 7.1.1.4 MiRNA-205 Expression in Karzinomen

Tab. 20: Durchschnittswerte der miR-205 Expression in Übergangsepithel-, Plattenepithel-, Basalzell- und Adenokarzinome sowie Organen mit starker Expression. Die Normalisierung erfolgte anhand der U6.

Gewebe/Karzinom		miR-205 [Ct-Wert ± Standard]	mittlerer miR-205 Wert [Ct-Wert ± Standard]
Organe	Vulva	20,06 ± 0,39	23,48 ± 2,57
	Tonsille	20,09 ± 0,75	
	Anus	20,59 ± 1,17	
	Mundschleimhaut	22,77 ± 0,14	
	Prostata	22,83 ± 0,11	
	Mamma	22,86 ± 0,19	
	Blase	23,14 ± 0,09	
	Ösophagus	23,76 ± 0,18	
	Portio	24,69 ± 0,08	
	Bronchus	26,90 ± 0,11	
	Lunge	27,24 ± 0,24	
Übergangsepithelkarzinom	Urothel	21,25 ± 0,19	23,45 ± 1,82
	Urothel	21,83 ± 0,21	
	Urothel	22,47 ± 0,26	
	Urothel	24,49 ± 0,78	
	Urothel	25,18 ± 0,79	
	Urothel	25,46 ± 0,02	
Basalzellkarzinom	Haut	24,29 ± 0,04	24,59 ± 0,43

	Haut	24,90 ± 0,21	
Plattenepithelkarzinom	Larynx	21,86 ± 0,02	24,97 ± 3,79
	Pharynx	22,55 ± 0,13	
	Zunge	22,96 ± 0,01	
	Mundboden	23,12 ± 0,08	
	Lunge	23,76 ± 0,28	
	Tonsille	24,13 ± 0,07	
	Lunge	25,75 ± 0,18	
	Pharynx	26,28 ± 0,15	
	Lunge	34,32 ± 0,05	
Adenokarzinom	Parotis	21,47 ± 0,31	31,49 ± 5,99
	Prostata	26,17 ± 0,21	
	Lunge	26,91 ± 0,07	
	Pankreas	28,89 ± 0,41	
	Lunge	32,89 ± 0,22	
	Colon	33,34 ± 0,00	
	Magen	36,93 ± 1,87	
	Ovar	38,22 ± 0,65	
	Colon	38,60 ± 0,15	

### 7.1.1.5 MiRNA-205 Expression in Zelllinien

Tab. 21: MiR-205 Expressionslevel diverser Zelllinien nach Normalisierung auf das miR-16 Expressionsniveau.

Zelllinie	miR-205 [Ct-Wert ± Standard]
JURKAT	40,00 ± 0,00
U937	40,00 ± 0,00
RAMOS	40,00 ± 0,00
HEK-293	40,00 ± 0,00
T24	40,00 ± 0,00
KU-19-19	20,77 ± 0,07
TCC-SUP	30,49 ± 0,26

### 7.1.1.6 MiRNA-205 Expression in Verdünnungsreihen

Tab. 22: MiR-205 Expressionslevel mehrerer Verdünnungsstufen von KU-19-19 in T24 Zellen.

Verdünnung	miR-205 [Ct-Wert ± Standard]
1:10	22,92 ± 0,44
1:100	27,09 ± 0,17
1:1000	29,57 ± 0,33
1:10000	33,91 ± 0,48
1:100000	36,78 ± 0,40

### 7.1.1.7 MiRNA-205 Expression in Sentinellymphknoten

Tab. 23: MiR-205 Expressionslevel in einem Sentinellymphknoten und dazugehörigen Referenzgeweben.

Gewebe	miR-205 [Ct-Wert ± Standard]
Haupttumor (80% Tumorzellen)	27,25 ± 1,18
Lymphknoten mit Metastase (60% Tumorzellen)	29,16 ± 1,16
Sentinellymphknoten (< 0,1% Tumorzellen)	34,15 ± 0,04
Lymphknoten ohne Metastase	40,00 ± 0,00

## 7.1.2 Transfektionsoptimierung

Tab. 24: Ergebnisse der Messungen von miR-205 Expressionsleveln nach Transfektionen mit unterschiedlichen Konzentrationen.

Zeit	50 nM [Ct-Wert ± Standard]	5 nM [Ct-Wert ± Standard]	0,5 nM [Ct-Wert ± Standard]
1h	13,59 ± 0,26	13,80 ± 0,04	21,39 ± 0,02
5h	13,93 ± 0,05	14,21 ± 0,09	22,00 ± 0,23
10h	14,27 ± 0,63	14,82 ± 0,06	23,59 ± 0,16
24h	16,16 ± 0,08	16,41 ± 0,13	24,42 ± 0,51
48h	16,98 ± 0,48	17,25 ± 0,87	24,93 ± 1,24

Tab. 25: MiR-205 Expressionswerte von transfizierten KU-19-19, T24 und TCC-SUP Zellen.

Ansatz	KU-19-19 [Ct-Wert ± Standard]	T24 [Ct-Wert ± Standard]	TCC-SUP [Ct-Wert ± Standard]
Pre-miR-205	15,83 ± 0,78	15,87 ± 1,20	15,95 ± 0,44
Anti-miR-205	23,29 ± 0,60		31,66 ± 2,69
Mock	21,43 ± 0,94	40,00 ± 0,00	29,89 ± 0,79
unbehandelt	20,77 ± 0,07	40,00 ± 0,00	30,49 ± 0,26

### 7.1.3 MiRNA-regulierte miRNA-Expression

Tab. 26: Ergebnisse der quantitativen RT-PCRs von miRNAs vor und nach Mock- bzw. miR-205 Transfektionen. Die Ergebnisse für miR-16 sind nicht normalisiert. Die Werte der übrigen miRNAs sind auf miR-16 normalisiert.

Ansatz	miR-16 [Ct-Wert ± Standard]	miR-184 [Ct-Wert ± Standard]	miR-203 [Ct-Wert ± Standard]	miR-205 [Ct-Wert ± Standard]
untransfiziert	28,40 ± 0,30	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00
Scramble-transfiziert (24h)	28,16 ± 0,50	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00
Scramble-transfiziert (48h)	28,08 ± 0,10	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00
miR-205-transfiziert (24h)	28,22 ± 0,60	34,18 ± 0,90	37,15 ± 1,00	25,64 ± 1,20
miR-205-transfiziert (48h)	28,66 ± 0,40	33,03 ± 1,30	35,75 ± 2,00	22,90 ± 1,70

### 7.1.4 MTT-Assay

Tab. 27: Ergebnisse der MTT-Assays von HEK-293 Zellen. In Klammern sind die Wahrscheinlichkeiten für eine Signifikanz in den Unterschieden der Zahl lebender Zellen zwischen miR-205 und Mock-transfizierten Zellen angegeben (gepaarter t-Test mit zweiseitiger Verteilung).

Ansatz	24h (Wert ± Standard [%])	48h (Wert ± Standard [%])	72h (Wert ± Standard [%])
Mock	100,00 ± 7,66	100,00 ± 4,77	100,00 ± 6,78
2500 Zellen (pre-miR-205)	61,03 ± 15,34 (p=0,0015)	64,05 ± 6,95 (p<0,0001)	77,07 ± 9,79 (p=0,0138)
5000 Zellen (pre-miR-205)	65,51 ± 9,59 (p=0,0022)	63,32 ± 7,95 (p<0,0001)	69,52 ± 8,78 (p=0,0001)
10000 Zellen (pre-miR-205)	68,56 ± 9,78 (p=0,0004)	80,69 ± 5,96 (p=0,0007)	84,88 ± 3,39 (p=0,0014)
2500 Zellen (anti-miR-205)	105,24 ± 8,36 (p=0,2656)	95,61 ± 10,13 (p=0,5098)	104,13 ± 7,07 (p=0,6746)
5000 Zellen (anti-miR-205)	96,50 ± 6,96 (p=0,3822)	99,44 ± 4,28 (p=0,9274)	95,47 ± 4,35 (p=0,3475)
10000 Zellen (anti-miR-205)	94,30 ± 9,86 (p=0,3136)	104,65 ± 5,11 (p=0,4149)	107,58 ± 3,16 (p=0,0018)

Tab. 28: Ergebnisse der MTT-Assays von T24 Zellen. In Klammern sind die Wahrscheinlichkeiten für eine Signifikanz der Unterschiede in der Zahl lebender Zellen zwischen miR-205 und Mock-transfizierten Zellen angegeben (gepaarter t-Test mit zweiseitiger Verteilung).

<b>Ansatz</b>	<b>24h</b> <b>(Wert ± Standard [%])</b>	<b>48h</b> <b>(Wert ± Standard [%])</b>	<b>72h</b> <b>(Wert ± Standard [%])</b>
Mock	100,00 ± 2,79	100,00 ± 1,96	100,00 ± 3,02
2500 Zellen (pre-miR-205)	80,92 ± 6,00 (p=0,0016)	83,26 ± 7,16 (p=0,0034)	82,07 ± 6,01 (p=0,0009)
5000 Zellen (pre-miR-205)	77,44 ± 6,25 (p=0,0002)	78,35 ± 4,90 (p=0,0009)	84,16 ± 8,17 (p=0,0053)
10000 Zellen (pre-miR-205)	78,38 ± 4,68 (p<0,0001)	79,35 ± 6,88 (p<0,0001)	80,50 ± 12,07 (p=0,0112)
2500 Zellen (anti-miR-205)	99,54 ± 7,47 (p=0,9226)	100,03 ± 6,88 (p=0,9943)	104,27 ± 5,83 (p=0,0806)
5000 Zellen (anti-miR-205)	105,34 ± 4,00 (p=0,2222)	98,58 ± 4,25 (p=0,5654)	101,91 ± 5,89 (p=0,6210)
10000 Zellen (anti-miR-205)	104,92 ± 4,63 (p=0,1342)	99,76 ± 5,33 (p=0,9567)	104,18 ± 5,20 (p=0,1744)

Tab. 29: Ergebnisse der MTT-Assays von KU-19-19 Zellen. In Klammern sind die Wahrscheinlichkeiten für eine Signifikanz der Unterschiede in der Zahl lebender Zellen zwischen miR-205 und Mock-transfizierten Zellen angegeben (gepaarter t-Test mit zweiseitiger Verteilung).

<b>Ansatz</b>	<b>24h</b> <b>(Wert ± Standard [%])</b>	<b>48h</b> <b>(Wert ± Standard [%])</b>	<b>72h</b> <b>(Wert ± Standard [%])</b>
Mock	100,00 ± 6,84	100,00 ± 9,69	100,00 ± 7,87
2500 Zellen (pre-miR-205)	11,05 ± 3,40	38,94 ± 3,31	21,10 ± 3,84
5000 Zellen (pre-miR-205)	113,74 ± 3,62	14,83 ± 3,76	33,49 ± 4,79
10000 Zellen (pre-miR-205)	58,39 ± 2,17 (p=0,0017)	53,87 ± 2,48 (p=0,0010)	60,76 ± 9,43 (p=0,0002)
2500 Zellen (anti-miR-205)	33,16 ± 3,63	31,56 ± 3,59	43,93 ± 4,27
5000 Zellen (anti-miR-205)	126,34 ± 5,65	39,94 ± 4,28	44,23 ± 3,63
10000 Zellen (anti-miR-205)	116,35 ± 5,36 (p=0,1554)	125,04 ± 7,00 (p=0,0339)	118,61 ± 5,90 (p=0,0099)

Tab. 30: Ergebnisse der MTT-Assays von TCC-SUP Zellen. In Klammern sind die Wahrscheinlichkeiten für eine Signifikanz der Unterschiede in der Zahl lebender Zellen zwischen miR-205 und Mock-transfizierten Zellen angegeben (gepaarter t-Test mit zweiseitiger Verteilung).

<b>Ansatz</b>	<b>24h</b> <b>(Wert ± Standard [%])</b>	<b>48h</b> <b>(Wert ± Standard [%])</b>	<b>72h</b> <b>(Wert ± Standard [%])</b>
Mock	100,00 ± 5,57	100,00 ± 4,86	100,00 ± 4,75
2500 Zellen (pre-miR-205)	77,88 ± 6,72 (p=0,0013)	78,90 ± 6,96 (p = 0,0001)	77,12 ± 7,62 (p = 0,0002)
5000 Zellen (pre-miR-205)	74,69 ± 7,00 (p=0,0003)	79,91 ± 7,04 (p = 0,0005)	81,31 ± 8,47 (p = 0,0004)
10000 Zellen (pre-miR-205)	78,22 ± 6,41 (p=0,0003)	99,38 ± 5,28 (p = 0,8447)	93,94 ± 6,63 (p = 0,0674)
2500 Zellen (anti-miR-205)	109,35 ± 3,35 (p=0,0079)	117,12 ± 2,11 (p = 0,0001)	109,89 ± 7,08 (p = 0,0338)
5000 Zellen (anti-miR-205)	105,73 ± 7,16 (p=0,1337)	112,52 ± 3,98 (p = 0,0025)	107,10 ± 5,21 (p = 0,0683)
10000 Zellen (anti-miR-205)	109,09 ± 3,73 (p=0,0353)	110,43 ± 5,86 (p = 0,0127)	81,55 ± 15,08 (p = 0,0072)

### 7.1.5 Quantitative RT-PCRs der mRNA-Expressionen von putativen Zielgenen

Tab. 31: Ergebnisse der quantitativen RT-PCR der mRNA-Expressionslevel von putativen Zielgenen der miR-205 nach Transfektionen.

<b>Gen</b>	<b>1h</b> [Ct ± Standard]	<b>5h</b> [Ct ± Standard]	<b>10h</b> [Ct ± Standard]	<b>24h</b> [Ct ± Standard]	<b>48h</b> [Ct ± Standard]
PHB	0,97 ± 0,08	0,92 ± 0,07	0,95 ± 0,05	0,99 ± 0,05	0,93 ± 0,06
SMAD1	1,09 ± 0,05	1,07 ± 0,06	0,97 ± 0,11	0,97 ± 0,15	1,07 ± 0,05
E2F5	0,99 ± 0,11	1,00 ± 0,05	0,83 ± 0,07	0,57 ± 0,06	0,71 ± 0,05
ERBB3	1,06 ± 0,05	1,07 ± 0,04	0,81 ± 0,08	0,57 ± 0,07	0,27 ± 0,07
ARTS	0,99 ± 0,08	1,00 ± 0,08	0,87 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,36 ± 0,05
DGCR8	0,97 ± 0,02	0,93 ± 0,04	1,00 ± 0,03	0,74 ± 0,01	0,73 ± 0,05
INPPL1	1,05 ± 0,10	1,02 ± 0,09	0,84 ± 0,06	0,66 ± 0,02	0,76 ± 0,08
PKCB	1,05 ± 0,01	0,93 ± 0,04	0,78 ± 0,10	0,62 ± 0,09	0,68 ± 0,05
E2F1	1,07 ± 0,02	1,06 ± 0,07	1,07 ± 0,07	1,02 ± 0,01	1,04 ± 0,10
TP53BP2	1,08 ± 0,08	1,08 ± 0,06	1,10 ± 0,05	0,98 ± 0,08	1,05 ± 0,03

### 7.1.6 Luciferase-Assay

Tab. 32: Ergebnisse der Luciferase-Assays der beiden Zielgene ARTS und INPPL1 in HEK-293 Zellen. In Klammern sind die Wahrscheinlichkeiten für eine Signifikanz der Unterschiede der relativen Luciferaseaktivitäten zwischen negativen und pre-miR-205 transfizierten Ansätzen angegeben (gepaarter t-Test mit zweiseitiger Verteilung).

<b>Ansatz</b>		<b>Relative Luciferaseaktivität (Wert ± Standard [%])</b>
ARTS	Kontrolle	100 ± 4,97
	Pre-miR-205	45,08 ± 16,57 (p=0,000006)
INPPL1	Kontrolle	100 ± 13,08
	Pre-miR-205	48,18 ± 25,32 (p=0,000002)

Tab. 33: Ergebnisse der Luciferase-Assays der beiden Zielgene ARTS und INPPL1 in KU-19-19 Zellen. In Klammern sind die Wahrscheinlichkeiten für eine Signifikanz der Unterschiede der relativen Luciferaseaktivitäten zwischen negativen und pre-miR-205 transfizierten Ansätzen angegeben (gepaarter t-Test mit zweiseitiger Verteilung).

Ansatz		Relative Luciferaseaktivität (Wert $\pm$ Standard [%])
ARTS	Kontrolle	100 $\pm$ 37,57
	Pre-miR-205	53,28 $\pm$ 18,67 (p=0,0019)
	Anti-miR-205	117,86 $\pm$ 20,34 (p=0,3025))
INPPL1	Kontrolle	100 $\pm$ 20,37
	Pre-miR-205	52,06 $\pm$ 21,44 (p=0,00001)
	Anti-miR-205	109,88 $\pm$ 22,28 (p=0,3867))

## 7.2 Sequenzen der 3'UTRs von ARTS und INPPL1

```

GGCTGGGGCAAAGGCCTGAAAGGGGAGAGAAGATTGGCGCTGGGTGCCGGGGCCCCTTTGGCTCCTCACCGTGA
TGCATTCTGCCTTCTGTCTACTAGGATGACAAGGAGTATGTGGGCTTTGCAACCCTCCCCAACCAAGTCCAC
CGAAAGTCCGTGAAGAAAGGCTTTGACTTTACCCCTCATGGTGGCAGGAGAGTCTGGCCTGGGCAAATCCACAC
TTGTCAATAGCCTCTTCTCACTGATCTGTACCGGGACCGGAAACTTCTTGGTGCTGAAGAGAGGATCATGCA
AACTGTGGAGATCACTAAGCATGCAGTGGACATAGAAGAGAAGGGTGTGAGGCTGCGGGCTCACCATTGTGGAC
ACACCAGGTTTTGGGGATGCAGTCAACAACACAGAGTGTGGAAAGCCTGTGGCAGAATACATTGATCAGCAGT
TTGAGCAGTATTTCCGAGACGAGAGTGGCCTGAACCGAAAAGAACATCCAAGACAACAGGGTGCAGTCTGCCT
GTACTTCATCTCACCCCTTCGGCCATGGGCTCCGGCCATTGGATGTTGAATTCATGAAGGCCCTGCATCAGCGG
GTCAACATCGTGCCTATCCTGGCTAAGGCAGACACACTGACACCTCCCGAAGTGGACCACAAGAAACGCAAAA
TCCGGGAGGAGATTGAGCATTGGAATCAAGATCTATCAATTCCCAGACTGTGACTCTGATGAGGATGAGGA
CTTCAAATTCAGGACCAAGCCCTAAAGGAAAGCATCCCATTGTCAGTAATTGGCAGCAACACTGTAGTAGAG
GCCAGAGGGCGGCGAGTTTCGGGGTGCAGTCTACCCCTGGGGCATCGTGGAAAGTGGAAAACCCAGGGCCTGCC
ACTTTGTGAAGCTGAGGACAATGCTGGTACGTACCCACATGCAGGACCTGAAGGATGTGACACGGGAGACACA
TTATGAGAACTACCGGGCACAGTGCATCCAGAGCATGACCCGCTGGTGGTGAAGGAACGGAATCGCAAGTAT
GACCAGAAGCCAGGACAAAGCTGGCAGGGGGAGATCCCAAGCCTAGCCTTGGGTGAGACCAAGCCCTACTTTT
GTTCTTCTATAGGCCCTGGGCTCAATCTAAGCGGGTGTGGGGTCCCTCCCTCGCCTTATCAACCCTTTTCTCCC
TTTAGCAAATGACTCGGGAAGTGGTACCGACTTCCCCATCCCTGCTGTCCCACCAGGGACAGATCCAGAAA
CTGAGAAGCTTATCCGAGAGAAAGATGAGGAGCTGCGGCGGATGCAGGAGATGCTACACAAAATACAAAAACA
GATTGAAGGAGAACTATTAAGTGGCTTTCAGCCCTGGATATTTAAATCTCCTCCTTCTTCTCCTGTCATGCCG
GCCCTCCCAGCACCAGCTCTGCTCAGGCCCTTCAGCTACTGCCACTTCGCCTTACATCCCTGCTGACTGCC
CAGAGACTCAGAGGAAATAAAGTTTAATAAATCTGTAGGTGGCT

```

Abb. 46: Sequenz der 3'UTR von ARTS. Dabei handelt es sich um die längste Transkriptvariante 4 mit 1504 bp. Rot markiert sind die putativen Bindestellen für miR-205.

```

TAGCGGAGGCCACCACGAAGCTGTGAACTCAGAGCCCTCCCTGCTACCAAGGCCCAGCTATGGCCCCAGGGTT
GAAAAGTTATGAGGGTCAGGGCAGTATCTCTCTGCCTATTTATTGGGGTGCCTATTTATTGGGGATCTGCATT
CCCCGCTGCCCAATCATTGCAATGCCCTAATTAGGGCATCCTGCCCTCGCCTTTTAGGCTCAGGACGGAAG
GTCAGTTGCCATGGTTACCGAGGACCCTGGTTACTCTGGTGTCTGCTGTTTACTGGACCCCGCTCCCAGC
CCCAGGGGTGCCTGTGGGGGTCCATTTGGGTACGTCTGGGCCCCCACTTTCACCAGTTTCTGCGGCCTTCCAC
CGGGCCTGAACCACAGCGGAGGAGCTCCGCTAAGACCTCCCCACCCCGCTGGGGGTGGGGGCGGGTGTCCGT
CCGGAATTGAAGGAATAGCCCAGGACCGGGCTGGGGTTTATTTAAACTGTTCTGTGTGGGTCTGGGGAGGGA
GAGCACCTTAATATTATTGGGGTTGGTTGGGGTGGGGCAGGATCTCAGCCATAAAGTGCCAGTTTGTCTAGTT
CTCACTGTCTCCTGGTCTGTGCTGCCCTGCTCTGGGGATGCACGGCGCAGGGTGGGGGAGGGAGGTTCTCG
CAGGTCTCAGCCCGGGACAGGGTCTTGCAAGCAGCCTCCTGGGCAGTCGTAAGGGTTGCGGCGTGATGTCTTC
AATAAATTAAGTTTTATTGG

```

Abb. 47: Sequenz der 3'UTR von INPPL1 mit einer Länge von 751 bp. Rot markiert ist die putative Bindestelle für miR-205.

### 7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Norbert Tautz für seine Bereitschaft die offizielle Betreuung dieser Dissertation zu übernehmen. Er ermöglicht dadurch die Prüfung an der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Lübeck.

Prof. Dr. Alfred C. Feller für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen und an mehreren Kongressen teilnehmen zu können.

Prof. Dr. Hartmut Merz für sein Interesse an dieser Dissertation und die freundliche Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter zu betreuen.

Dr. Christoph Thorns für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und die hilfreichen Ratschläge bezüglich der korrekten Formulierung von medizinischen Fakten.

Biggi Branke, Sabine Didlaukat, Inga Jensen und Tanja Oeltermann, die mir jederzeit mit ihrem umfassenden Wissen zur Seite standen.

Der Deutschen Studiengruppe Hochmaligner Non-Hodgkin Lymphome (DSHNHL) für die Bereitstellung des Patientenmaterials und der statistischen Auswertung. Ein besonderer Dank gilt dabei Dipl.-Math. Marita Ziepert, die innerhalb kürzester Zeit die statistischen Analysen zu den prognostisch relevante miRNAs durchführte. Auch bei Dr. Dirk Repsilber möchte ich mich für seine umfassende statistische Auswertung der miRNA-Expressionsdaten bedanken.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Physiologie, für die Möglichkeit die Messungen zur Luciferase-Aktivität dort durchführen zu können.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei Dr. Florian Stellmacher und Dr. Tiantom Jarutat für ihre stete Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude. Dies hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch für die unablässige Bereitschaft mich in die interessante Welt der Pathologie einzuführen, möchte ich meinen Dank an beide aussprechen. Das gleiche gilt für die „außeruniversitären“ Treffen, die auch nach den Weggängen der beiden weiterbestanden und ich stets sehr genossen habe.

Ein großes Dankeschön geht an Marlen Thiere, die mich in den letzten drei Jahren durch diverse Höhen und Tiefen begleitet hat. Ihr stetes Interesse an mir und meiner Arbeit hat entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Die gemeinsamen Abende und „tiefgründigen“ Gespräche werde ich stets in angenehmer Erinnerung behalten.

Letztendlich gebührt der größte Dank meinen Eltern, die mich stets in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Ohne sie wären mein Studium und auch diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Auch bei den übrigen Familienmitgliedern möchte ich mich für das entgegengebrachte Interesse und ihre Unterstützung bedanken. Ein besonders großes Dankeschön geht dabei an Juliane Röhle und Stephan Manthei, die, trotzdem sie ein schmerzvolles Jahr durchleben mussten, stets eine tolle Verbindung zu einem Leben ganz ohne Biologie herstellten.

---

## 7.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Anja Röhle  
Geburtsdatum: 09.07.1979  
Geburtsort: Bad Frankenhausen

### Schule

1986 – 1992 Grundschule, Niederlehme  
1992 – 1999 Friedrich-Wilhelm Gymnasium, Königs Wusterhausen  
Juni 1999 Abitur

### Studium

10/1999 – 08/2005 Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin (Schwerpunkte: Genetik, Molekularbiologie und Biochemie, Zoologie)  
10/2004 – 07/2005 Diplomarbeit am Institut für Biologie – Genetik (Thema: Charakterisierung von CG14059, eines durch Transdetermination induzierbaren Gens von *Drosophila melanogaster*.)  
Juli 2005 Abschluss als Diplom-Biologin

### Promotion

seit 09/2005 Promotion am Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck

## **7.5 Erklärung**

Gemäß §8 Abs. 1 der Promotionsordnung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe weder anderweitig versucht eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Anja Röhle